

Liposome-entrapped topoisomerase inhibitors

Publication number: CN1323199 (A)

Publication date: 2001-11-21

Inventor(s): SLATER J L [US]; COLBERN G T [US]; WORKING P K [US]

Applicant(s): ALZA CORP [US]

Classification:

- International: A61K9/127; A61K31/00; A61K31/352; A61K31/435; A61K31/4375; A61K31/473; A61K31/4745; A61K45/00; A61K47/28; A61K47/34; A61K47/36; A61K47/44; A61P35/00; A61P43/00; A61K9/127; A61K31/00; A61K31/352; A61K31/435; A61K31/4353; A61K31/473; A61K31/4738; A61K45/00; A61K47/28; A61K47/34; A61K47/36; A61K47/44; A61P35/00; A61P43/00; (IPC1-7): A61K9/127; A61K31/4745; A61P35/00

- European: A61K9/127B; A61K31/00; A61K31/473; A61K31/4745

Application number: CN19998012207 19991015

Priority number(s): US19980104671P 19980916

Also published as:

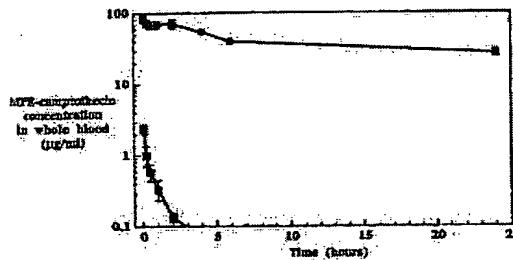
- CN1205923 (C)
- WO0023052 (A1)
- ZA200103063 (A)
- PT1121102 (E)
- NZ511112 (A)

[more >>](#)

Abstract not available for CN 1323199 (A)

Abstract of corresponding document: WO 0023052 (A1)

A composition for administration of a therapeutically effective dose of a topoisomerase inhibitor I or topoisomerase I/II inhibitor is described. The composition includes liposomes having an outer surface and an inner surface defining aqueous liposome compartment, and being composed of a vesicle-forming lipid and of a vesicle-forming lipid derivatized with a hydrophilic polymer to form a coating of hydrophilic polymer chains on both the inner and outer surfaces of the liposomes. Entrapped in the liposomes is the topoisomerase inhibitor at a concentration of at least about 0.10 mu mole drug per mu mole lipid.



Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 9/127

A61K 31/4745 A61P 35/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99812207.6

[43] 公开日 2001 年 11 月 21 日

[11] 公开号 CN 1323199A

[22] 申请日 1999.10.15 [21] 申请号 99812207.6

[30] 优先权

[32] 1998.10.16 [33] US [31] 60/104,671

[86] 国际申请 PCT/US99/24228 1999.10.15

[87] 国际公布 WO00/23052 英 2000.4.27

[85] 进入国家阶段日期 2001.4.16

[71] 申请人 阿尔萨公司

地址 美国加利福尼亚

[72] 发明人 J·L·司拉特 G·T·科尔波恩
P·K·沃尔金

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

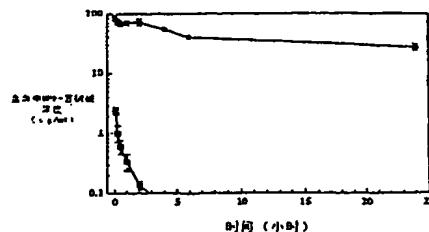
代理人 李华英

权利要求书 2 页 说明书 31 页 附图页数 7 页

[54] 发明名称 脂质体包封的拓扑异构酶抑制剂

[57] 摘要

描述了用于给予治疗有效量拓扑异构酶 I 抑制剂或拓扑异构酶 I / II 抑制剂的组合物。该组合物包括具有确定含水脂质体室的外表面和内表面的脂质体，脂质体含有可成囊类脂和用亲水聚合物衍生化的可成囊类脂并且脂质体内外两个表面为亲水聚合物链的包衣层。包封于脂质体中的拓扑异构酶抑制剂的浓度至少为 0.10 微摩尔药物/微摩尔类脂。



ISSN 1008-4274

权利要求书

1. 一种用于治疗患者肿瘤的组合物，包括含有可成囊类脂和 1-20 摩尔% 的用亲水聚合物衍生化的可成囊类脂的脂质体，在聚合物能分布于脂质体双层膜两侧上的条件下形成所述脂质体；和

包封于脂质体中的至少 0.10 微摩尔药物/微摩尔类脂的拓扑异构酶抑制剂，所述脂质体具有内/外离子梯度，足以使特定浓度的拓扑异构酶抑制剂保留在脂质体中。

2. 如权利要求 1 的组合物，其中拓扑异构酶抑制剂选自包括喜树碱和喜树碱衍生物的拓扑异构酶 I 抑制剂。

3. 如权利要求 2 的组合物，其中喜树碱衍生物选自于 9-氨基喜树碱、7-乙基喜树碱、10-羟基喜树碱、9-硝基喜树碱、10, 11-亚甲二氧基喜树碱、9-氨基-10, 11-亚甲二氧基喜树碱、9-氯-10, 11-亚甲二氧基喜树碱、伊立替康、拓扑替康、(7-(4-甲基哌嗪亚甲基)-10, 11-亚乙二氧基-20(S)-喜树碱，7-(4-甲基哌嗪亚甲基)-10, 11-亚甲二氧基-20(S)-喜树碱和 7-(2-N-异丙基氨基)乙基)-(20S)-喜树碱。

4. 如权利要求 1 的组合物，其中拓扑异构酶抑制剂是选自 6-[[2-(二甲基氨基)-乙基]氨基]-3-羟基-7H-茚并[2, 1-c]喹啉-7-酮二盐酸化物，阿佐特星和 3-甲氧基-11H-吡啶[3', 4'-4, 5]吡咯[3, 2-c]喹啉-1, 4-二酮的拓扑异构酶 I / II 抑制剂。

5. 如权利要求 1 的组合物，其中亲水聚合物是分子量为 500-5, 000 道尔顿的聚乙二醇。

6. 如任一前述权利要求中的组合物，其中脂质体包括相变温度在 37 °C 以上的可成囊类脂。

7. 如权利要求 6 的组合物，其中可成囊类脂选自氢化大豆卵磷脂、二硬脂酰卵磷脂和鞘磷脂。

8. 如权利要求 6 的组合物，其中脂质体包括 20-94 摩尔% 的氢化大豆卵磷脂、1-20 摩尔% 的用聚二乙醇衍生化的二硬脂酰磷脂酰乙醇胺和 5-60 摩尔% 的胆固醇。

9. 如权利要求 6 的组合物，其中脂质体包括 30-65 摩尔% 的氢化大豆卵磷脂、5-20 摩尔% 的用聚二乙醇衍生化的二硬脂酰磷脂酰乙醇胺和 30-50 摩尔% 的胆固醇。

10. 如权利要求 6 的组合物，其中脂质体包括 20-94 摩尔% 的二硬脂酰卵磷脂和 1-20 摩尔% 的用聚二乙醇衍生化的二硬脂酰磷脂酰乙醇胺。

11. 如权利要求 1-10 中任一项的组合物，其中脂质体中包括多阴离子聚合物，所述聚合物能与所述拓扑异构酶抑制剂形成复合物。

12. 如权利要求 12 的组合物，其中所述多阴离子聚合物选自右旋糖酐硫酸盐、硫酸软骨素 A、聚乙烯磷酸和多磷酸。

13. 一种用于拓扑异构酶抑制剂给药的组合物，包括含有可成囊类脂的脂质体，并且脂质体的内/外离子梯度足以使药物保留在脂质体中；和包封于脂质体中的浓度至少为 0.20 微摩尔药物/微摩尔类脂的拓扑异构酶抑制剂。

14. 如权利要求 13 的组合物，其中拓扑异构酶抑制剂是选自于 MPE-喜树碱、拓扑替康和 (7-(2-N-异丙基氨基)乙基)-(20S)-喜树碱的拓扑异构酶 I 抑制剂。

15. 如权利要求 13 的组合物，其中拓扑异构酶抑制剂是选自于 6-[[2-(二甲氨基)-乙基]氨基]-3-羟基-7H-茚并[2,1-c]喹啉-7-酮二盐酸化物和 3-甲氧基-11H-吡啶[3',4'-4,5]吡咯[3,2-c]喹啉-1, 4-二酮的拓扑异构酶 I / II 抑制剂。

16. 如权利要求 13 的组合物，其中脂质体中进一步包括多阴离子聚合物，所述聚合物能和所述拓扑异构酶抑制剂形成复合物。

17. 如前述权利要求任一项的组合物用作治疗肿瘤的药物用途。

18. 如权利要求 1-16 任一项的组合物在制备用于治疗患者肿瘤的药物中的用途。

说 明 书

脂质体包封的拓扑异构酶抑制剂

发明领域

本发明涉及含有被包封的拓扑异构酶抑制剂的脂质体组合物。

发明背景

在美国，癌症是仅次于心脏疾病的主要死亡因素，每年的死亡者超过 500,000. (Katzung, B., "Basic and Clinical Pharmacology", 第 7 版, Appleton & Lange, Stamford CT, 1998, 第 882 页). 目前的治疗方法中，三分之一的病人采用局部方法治疗如手术或放射治疗，这在肿瘤没有扩散时确实有效。早期诊断可使采用局部治疗的病人治愈率提高。然而，在许多病例中，早期微扩散是肿瘤的一个特征，这表明需要全身治疗例如化疗，与局部治疗并用对于肿瘤的控制行之有效。

对于某些诊断期间就已全部或微散播的扩散性肿瘤来说，化疗是有效的。这些包括睾丸癌、扩散性大细胞淋巴癌、霍奇森病和绒毛膜癌及儿童肿瘤如急性淋巴细胞白血病。对于扩散性癌症的其他类型来说，化疗提供的是一种缓解性而非治愈性治疗。有效的缓解性治疗可暂时清除癌症的症状和征兆以及延长生命。最近的进展表明，化疗对一些癌症肿瘤的化学控制是可能的。

用于癌症治疗的一类药物是拓扑异构酶抑制剂。这些化合物抑制拓扑异构酶的酶活性，该酶参与 DNA 的复制、修复、遗传重组和转录。拓扑异构酶抑制剂的一个例子是喜树碱，为一种干扰拓扑异构酶 I 活性的天然化合物，该酶涉及 DNA 复制和 RNA 转录。喜树碱及喜树碱类似物拓扑替康 (topotecan) 及伊立替康 (irinotecan) 已被批准用于临床。

通过干扰拓扑异构酶 I 的断裂/重新连接活性，喜树碱及其类似物对癌症的化疗有效。这种化合物稳定并形成一种可逆的酶-喜树碱-DNA 三元复合物，该复合物能阻止拓扑异构酶反应中断裂/连接循环中的重新连接步骤。

喜树碱存在的一个问题是水不溶性，这妨碍了药物的运送。已制备了许多喜树碱类似物以改善此类化合物的水溶解性。喜树碱及其类似物的另一个问题是其 α -羟基内酯环在水环境中易于水解。内酯环开环形成药物的羧酸盐形式而表现为极低的抗拓扑异构酶 I 活性。

已有许多方法描述了改善喜树碱及其类似物的稳定性。其中一个方法是将化合物包封在脂质体中。

Burke (US5552156) 描述了一种脂质体组合物，试图解决喜树碱及其类似物的不稳定性，该方法是将化合物包封在脂质体中，该脂质体具有一个允许化合物渗透、嵌入的脂质双层膜。当化合物嵌入双层膜中，它在脂质体中心远离水环境从而避免了水解。

该方法的一个问题在于脂质体被网状内皮系统 (RES) 快速从血液中清除掉，这样就阻止了药物的运送尤其是在肿瘤部位的聚集。

Subramanian 和 Muller 等 (*Oncology Research*, 7(9): 461-469 (1995)) 描述了拓扑替康的脂质体制剂，并且报道以脂质体包封的形式可稳定拓扑替康避免因其内酯环水解而造成的失活。然而，这种脂质体包封药物的体外生物活性仅为游离药物的 60%。

Lundberg (*Anti-Cancer Drug Design*, 13: 453 (1998)) 描述了喜树碱类似物的两种亲脂性、油酸酯衍生物，所述喜树碱类似物包封于脂质体中并嵌入双层膜中以稳定其内酯环。Daoud (*Anti-Cancer Drug*, 6:83-93 (1995)) 描述了包括嵌入双层膜上的喜树碱的脂质体组合物。这些参考中的脂质体均为常规方法制得，即药物被动包封于脂质体中且将药物隐蔽在脂质双层膜中得以稳定。该方法制得的脂质体难以负载足够量的药物以达到临床疗效。

因此，本领域仍需要具有以下特性的脂质体制剂：(i) 包括一种拓扑异构酶抑制剂，例如喜树碱及其类似物；(ii) 在血流中能维持较长时间；(iii) 保持抗癌活性；和(iv) 包括所负载的足够量临床用药物。

发明简述

相应地，本发明的一个目的是提供用于改善癌症治疗的拓扑异构酶抑

制剂组合物。

本发明的另一个目的是提供用于抗肿瘤治疗的拓扑异构酶抑制剂给药的脂质体组合物。

另一方面，本发明包括一种用于治疗患者肿瘤的组合物，它包括含有可成囊类脂和 1-20 摩尔 % 的用亲水聚合物衍生化的可成囊类脂的脂质体。所述脂质体在聚合物能分布于脂质体双层膜两侧上的条件下形成。脂质体中包封的的是拓扑异构酶 I 抑制剂或拓扑异构酶 I / II 抑制剂，其浓度至少为 0.10 微摩尔药物/微摩尔类脂。脂质体具有一定的内/外离子梯度，该梯度足以使特定浓度的拓扑异构酶 I 抑制剂或拓扑异构酶 I/II 抑制剂保留在脂质体中。

在一个实施方案中，拓扑异构酶抑制剂是选自包括喜树碱及其衍生物的拓扑异构酶 I 抑制剂。例如，喜树碱衍生物可以是 9-氨基喜树碱、7-乙基喜树碱、10-羟基喜树碱、9-硝基喜树碱、10, 11-亚甲二氧基喜树碱、9-氨基-10, 11-亚甲二氧基喜树碱或 9-氯-10, 11-亚甲二氧基喜树碱。

在另一实施方案中，喜树碱衍生物为伊立替康、拓扑替康、(7-(4-甲基哌嗪亚甲基)-10, 11-亚乙二氧基-20(S)-喜树碱，7-(4-甲基哌嗪亚甲基)-10, 11-亚甲二氧基-20(S)-喜树碱或 7-(2-N-异丙氨基)乙基)-(20S)-喜树碱。

在另一实施方案中，拓扑异构酶抑制剂是拓扑异构酶 I / II 抑制剂，例如 6-[[2- (二甲基氨基) -乙基]氨基]-3-羟基-7H-茚并[2, 1-c]喹啉-7-酮二盐酸化物，阿佐特星(azotoxin)或 3-甲氧基-11H-吡啶[3', 4'-4, 5]吡咯[3, 2-c]喹啉-1, 4-二酮。

脂质体组合物中所含的亲水性聚合物可以是聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯基甲基醚、聚甲基噁唑烷、聚乙基噁唑烷、聚羟丙基噁唑烷、聚羟丙基甲基丙烯酰胺、聚甲基丙烯酰胺、聚二甲基丙烯酰胺、聚甲基丙烯酸羟丙酯、聚丙烯酸羟乙酯、羟甲基纤维素、羟乙基纤维素、聚乙二醇和聚天冬酰胺。

在优选实施方案中，亲水性聚合物为分子量为 500-5, 000 道尔顿的聚

乙二醇。

在另一实施方案中，脂质体进一步包括相变温度高于 37°C 的可成囊类脂。

在另一实施方案中，可成囊类脂为氢化大豆卵磷脂、二硬脂酰卵磷脂或鞘磷脂。一个优选的脂质体组合物含有 20-94 摩尔 % 的氢化大豆卵磷脂、1-20 摩尔 % 的用聚二乙醇衍生化的二硬脂酰卵磷脂和 5-60 摩尔 % 的胆固醇。

另一优选组合物中包括 30-65 摩尔 % 的氢化大豆卵磷脂、5-20 摩尔 % 的用聚二乙醇衍生化的二硬脂酰卵磷脂和 30-50 摩尔 % 的胆固醇。

另一方面，本发明包括用于拓扑异构酶 I 抑制剂或拓扑异构酶 I / II 抑制剂给药的组合物，包括含有可成囊类脂并具有一定的内/外离子梯度的脂质体，该梯度足以使药物保留在脂质体中。脂质体中包封的是拓扑异构酶 I 抑制剂或拓扑异构酶 I / II 抑制剂，其浓度至少为 0.20 微摩尔药物/微摩尔类脂。

另一方面，本发明包括治疗患者肿瘤的方法，包括制备含有用亲水聚合物链衍生化的 1-20 摩尔 % 的可成囊类脂的脂质体，所述脂质体在聚合物能分布于脂质体双层膜两侧上的条件下形成。脂质体中包封的是拓扑异构酶 I 抑制剂或拓扑异构酶 I / II 抑制剂，其浓度至少为 0.10 微摩尔/微摩尔类脂。脂质体具有一定的内/外离子梯度，该梯度足以使特定浓度的拓扑异构酶 I 抑制剂或拓扑异构酶 I / II 抑制剂保留在脂质体中。然后将脂质体给予受试者。

在这方面的另一个实施方案中，方法进一步包括采用遥控载药法 (remote loading) 例如硫酸铵梯度将拓扑异构酶 I 抑制剂或拓扑异构酶 I / II 抑制剂包封在脂质体中。

结合附图阅读下面的详细描述，本发明的这些及其他目的和特征将得到更为全面的理解。

附图简述

图 1A 为脂质体包封的 MPE-喜树碱 (实心圆) 与游离药物 (实心方形)

相比的血循环时间曲线. 以注射剂量的百分数为时间的函数。

图 1B 为给予大鼠脂质体包封的 MPE-喜树碱 (实心圆) 和游离 (非脂质体) MPE-喜树碱 (实心方形) 后 MPE-喜树碱血药浓度随时间 (小时) 变化曲线。

图 2A 为接种 HT-29 结肠肿瘤后小鼠的体重 (g) 随时间 (天) 变化曲线。于接种肿瘤后第 10、16 和 23 天, 给予动物 24mg/kg (实心圆)、15 mg/kg (实心三角) 和 6 mg/kg (实心方形) 脂质体包封的 MPE-喜树碱和 24mg/kg (空心圆)、15 mg/kg (空心三角) 和 6 mg/kg (空心方形) 游离形式的 MPE-喜树碱。

图 2B 为接种 HT-29 结肠肿瘤后肿瘤体积 (mm^3) 随时间 (天) 变化曲线。于接种肿瘤后第 10、16 和 23 天, 给予动物 24mg/kg (实心圆)、15 mg/kg (实心三角) 和 6 mg/kg (实心方形) 脂质体包封的 MPE-喜树碱和 24mg/kg (空心圆)、15 mg/kg (空心三角) 和 6 mg/kg (空心方形) 游离形式的 MPE-喜树碱。

图 3A 为接种 HT-29 结肠肿瘤后小鼠的体重 (g) 随时间 (天) 变化曲线。于接种肿瘤后第 9、16 和 23 天, 给予动物 5mg/kg (空心三角)、3 mg/kg (空心倒三角)、1 mg/kg (空心菱形)、0.5 mg/kg (空心圆) 和 0.1 mg/kg (空心方形) 脂质体包封的 MPE-喜树碱和 20mg/kg 游离形式的 MPE-喜树碱。

图 3B 为接种 HT-29 结肠肿瘤后肿瘤体积 (mm^3) 随时间 (天) 变化曲线。于接种肿瘤后第 9、16 和 23 天, 给予动物 5mg/kg (空心三角)、3 mg/kg (空心倒三角)、1 mg/kg (空心菱形)、0.5 mg/kg (空心圆) 和 0.1 mg/kg (空心方形) 脂质体包封的 MPE-喜树碱和 20mg/kg 游离形式的 MPE-喜树碱。

图 4A-4B 为给予大鼠脂质体包封的拓扑替康 (实心三角) 和游离 (非脂质体) 拓扑替康 (实心方形) 后拓扑替康血浆浓度随时间 (小时) 变化曲线。图 4A 和图 4B 分别给予 2mg/kg 和 5 mg/kg。

图 5A 为接种 HT-29 结肠肿瘤后小鼠的体重 (g) 随时间 (天) 变化曲线。于接种肿瘤后第 9、16 和 23 天, 给予动物 2mg/kg (菱形)、5 mg/kg

(圆) 和 8 mg/kg (空心方形) 脂质体包封的拓扑替康; 4 mg/kg 脂质体包封的 MPE-喜树碱 (三角); 25mg/kg 游离形式的拓扑替康 (倒三角) 和盐水 (实心方形)。

图 5B 为接种 HT-29 结肠肿瘤后肿瘤体积 (mm^3) 随时间 (天) 变化曲线。于接种后第 9、16 和 23 天, 给予动物 2mg/kg (菱形)、5 mg/kg (圆) 和 8 mg/kg (空心方形) 脂质体包封的拓扑替康; 4 mg/kg 脂质体包封的 MPE-喜树碱 (三角); 25mg/kg 游离形式的拓扑替康 (倒三角) 和盐水 (实心方形)。

图 6 为给予大鼠脂质体包封的 CKD602 (实心圆) 和游离 (非脂质体) 拓扑替康 (实心方形) 后 CKD602 血浆浓度随时间 (小时) 变化曲线。

图 7A 为接种 HT-29 结肠肿瘤后小鼠的体重 (g) 随时间 (天) 变化曲线。于接种肿瘤后第 9、16 和 23 天, 给予动物 4mg/kg (菱形)、2 mg/kg (圆) 和 1 mg/kg (空心方形) 脂质体包封的 CKD602; 4 mg/kg 脂质体包封的 MPE-喜树碱 (三角); 20mg/kg 游离形式的 CKD602 (倒三角) 和盐水 (实心方形)。

图 7B 为接种 HT-29 结肠肿瘤后肿瘤体积 (mm^3) 随时间 (天) 变化曲线。于接种后第 9、16 和 23 天, 给予动物 4mg/kg (菱形)、2 mg/kg (圆) 和 1 mg/kg (空心方形) 脂质体包封的 CKD602; 4 mg/kg 脂质体包封的 MPE-喜树碱 (三角); 20mg/kg 游离形式的 CKD602 (倒三角) 和盐水 (实心方形)。

发明的详细描述

1. 定义

除非另有所指, 以下术语具有下述含义。

“有效量”或“有效剂量”指抑制不良细胞生长例如阻止不良细胞生长或减少已有的细胞生长如肿瘤细胞生长所需的量。该有效量受本领域已知的因素影响, 例如细胞生长的类型、给药的方式方法、受试者的年龄、细胞生长的严重性等。本领域技术人员会考虑到这些因素并确定相应的有效量。

“治疗上有效的抗肿瘤疗法”指能有效地保持或降低原发肿瘤或转移肿瘤的大小如体积的治疗方法。

“拓扑异构酶 I 抑制剂”指能抑制或降低拓扑异构酶 I 的活性的任何化合物。

“拓扑异构酶 I / II 抑制剂”指能同时抑制或降低拓扑异构酶 I 和拓扑异构酶 II 的活性的任何化合物。

“拓扑异构酶抑制剂”指拓扑异构酶 I 抑制剂或拓扑异构酶 I / II 抑制剂。

“MPE-喜树碱”指 7-(4-甲基哌嗪亚甲基)-10, 11-亚乙二氧基-20(S)-喜树碱。

“拓扑替康”指 9-二甲基-氨基甲基-10-羟基喜树碱。

“CKD-602”指 7-(2-N-异丙氨基)乙基)-(20S)-喜树碱。

II. 脂质体组合物

本发明涉及用于拓扑异构酶 I 抑制剂或拓扑异构酶 I / II 抑制剂给药的脂质体组合物。在支持本发明的实验中，将下述三种拓扑异构酶抑制剂包封在脂质体中并研究了其体内特性：拓扑替康，7-(4-甲基哌嗪亚甲基)-10, 11-亚乙二氧基-20(S)-喜树碱(此处指“MPE-喜树碱”)和 7-(2-N-异丙氨基)乙基)-(20S)-喜树碱(此处指“CKD-602”)。如下面将要描述的，采用遥控载药法将药物包封到脂质体中以使较高的药物负载稳定地保留在脂质体中。制剂的体内实验证明：与用游离形式的拓扑异构酶治疗相比，脂质体组合物令人惊奇地提高了治疗活性。更具体地，如下面将要描述的，达到治疗性抗癌疗法所需脂质体包封的拓扑异构酶 I 抑制剂 MPE-喜树碱的剂量要比游离药物剂量低 20 倍。

在这部分，将描述脂质体组合物，包括脂质体的制备方法。

A. 脂质体的组成

适用于本发明的脂质体包括那些主要由可成囊类脂组成的脂质体。可成囊类脂例如磷脂在水中可自发形成双层囊。脂质体也可包括掺入脂

质双层的其他一些类脂，这些类脂具有与内部相连的疏水基、双层膜疏水区域和伸向外部、双层膜极性表面的首基。

可成囊类脂优选具有两条烃链、典型地为酰基链，和一个极性或非极性首基。有许多合成的和天然的可成囊类脂，包括磷脂，如卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、磷脂酸、磷脂酰肌醇和神经鞘磷脂，其中典型地两条烃链有 14-22 个碳原子并具有不同的饱和度。上面所描述的具有不同饱和度酰基链的类脂和磷脂可由市售购得或按公开的方法制得。其他适宜的类脂包括糖脂和甾醇如胆固醇。

阳离子类脂作为脂质组合物中的次要或主要或唯一成分也适用于本发明脂质体。此类阳离子类脂典型地有一个亲脂部分如甾醇、酰基或二酰基链，其中类脂荷净正电。优选地，类脂的首基荷正电。示例性的阳离子类脂包括 1, 2-二油基氨基-3-(三甲基氨基)丙烷(DOTAP)；N-1-(2, 3,-双十四烷基氧)丙基]-N, N-二甲基-N-羟乙基溴化铵(DMRIE)；N-1-(2, 3,-二油基氧)丙基]-N, N-二甲基-N-羟乙基溴化铵(DORIE)；N-[1-(2, 3-二油基氧)丙基]-N, N, N-三甲基氯化铵(DOTMA)；3[N-(N', N'-二甲基氨基乙基)氨基甲酰基]胆固醇(DC-Chol)；和二甲基双十八烷基铵(DDAB)。

可成囊的阳离子类脂也可以是中性类脂，例如二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)或两亲性类脂如磷脂，用阳离子类脂如多溶素或其它多元胺类脂衍生化。例如中性类脂(DOPE)即可用多溶素衍生为阳离子类脂。

在另一实施方案中，选择可成囊类脂以达到特定程度的流动性或刚性，目的是控制脂质体在血清中的稳定性和控制脂质体所包封药物的释放速率。

通过掺入相对刚性的类脂，例如有较高相变温度如高于室温、优选高于体温和直至 80°C 的类脂，可以使脂质体具有更刚性的脂质双层或液晶态双层。刚性的例如饱和类脂使脂质双层膜更具刚性。已知其他类脂成分例如胆固醇对脂质双层结构的膜刚性也有贡献。

另一方面，通过掺入相对流动性的类脂，典型地具有较低的液态-液晶态相变温度如等于或低于室温、更优选等于或低于体温的类脂相的类脂来改善类脂的流动性。

主要相变温度约为 2-80°C 的可成囊类脂适于用作本发明组合物的脂质体基本成分。在一个优选实施方案中，采用主要相变温度高于 37°C 的可成囊类脂作为脂质体的基本类脂成分。在另一优选实施方案中，采用了相变温度 37-70°C 的类脂。作为示例，类脂二硬脂酰卵磷脂 (DSPC) 的主要相变温度为 55.1°C，类脂氢化大豆卵磷脂 (HSPC) 的相变温度为 58°C。许多类脂的相变温度数据在多种出版物中均有列表说明，例如在 Avanti 极性类脂目录和类脂热至相变数据 (Lipid, Nist 标准参考数据 34) 中。

脂质体也包括用亲水聚合物衍生化的可成囊类脂。如在 US5013556 和 WO98/07409 中所描述的，在此引入作为参考。该亲水聚合物为脂质体的脂质双层膜内外表面提供了一种亲水聚合物链表面包衣。最外层的亲水聚合物链包衣使脂质体在体内具有较长血液循环时间。内层的亲水聚合物链包衣则伸向脂质体的水相室即脂质双层之间和中央核心室内部，并且于通过遥控载药负载化合物之后与所包封化合物接触。如下面将要说明的，亲水聚合物链包衣分布于脂质体表面内外的脂质体制剂，将用于提供化合物被保留在脂质体中的拓扑异构酶 I 抑制剂或拓扑异构酶 I / II 抑制剂组合物以提高治疗活性。

适于用亲水性聚合物衍生化的可成囊类脂包括任何上述所列的类脂，具体为磷脂如二油酰基磷脂酰乙醇胺 (DSPE)。

适于对可成囊类脂衍生化的亲水性聚合物包括聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯基甲基醚、聚甲基噁唑烷、聚乙基噁唑烷、聚羟丙基噁唑烷、聚羟丙基甲基丙烯酰胺、聚甲基丙烯酰胺、聚二甲基丙烯酰胺、聚甲基丙烯酸羟丙酯、聚丙烯酸羟乙酯、羟甲基纤维素、羟乙基纤维素、聚乙二醇和聚天冬酰胺。上述聚合物可用作均聚物或嵌段或无规则聚合物。

一种优选的亲水性聚合物链是聚乙二醇 (PEG)，优选 PEG 链分子量为 500-10,000 道尔顿、更优选 500-5,000 道尔顿、最优选 1,000-2,000 道尔顿。也优选可市售购得的具有多种聚合物大小的以甲氧基或乙氧基封端的 PEG 类似物作为亲水性聚合物，例如 120-20,000 道尔顿。

有关用亲水性聚合物衍生化可成囊类脂的制备方法已有描述，例如 US5395619。制备含有此种衍生化类脂的脂质体的方法也已有描述，其中

脂质体制剂中典型地包括 1-20 摩耳% 的衍生化类脂。容易理解，亲水性聚合物可稳定地与类脂偶联或以一种不稳定的键结合到类脂上，这种键使得被包衣的脂质体在血流中或应激反应中使聚合物链包衣从脂质体上脱落下来。

B. 拓扑异构酶抑制剂

本发明脂质体包括一种包封于脂质体中的拓扑异构酶抑制剂。包封是试图将药物包封在脂质体的水相核心和水相空间中。容易理解，具有一定疏水性的化合物也可被包封于脂质体的脂质双层中。

拓扑异构酶催化 DNA 超螺旋的引入 (introduction) 和松弛。已知几种类型的具有不同特异性的酶对于 DNA 的复制、修复、基因重组和转录十分重要。名为拓扑异构酶 I 的最简单的拓扑异构酶能松弛超螺旋的 DNA，这是一个在能量方面自发的过程。已知为拓扑异构酶 II 的促旋酶可催化 DNA 负超螺旋扭转的引入，该过程需要能量并且是 ATP 依赖的。在 DNA 复制过程中，拓扑异构酶 I 和 II 均具有松弛由解旋酶在复制叉前方引入的正超螺旋的功能。另外，促旋酶能在单链 DNA 出现的片段处引入负扭转。

拓扑异构酶抑制剂是能抑制拓扑异构酶活性的化合物。已知可抑制拓扑异构酶 I 活性的化合物被用作拓扑异构酶 I 抑制剂，而可抑制拓扑异构酶 II 活性的化合物被用作拓扑异构酶 II 抑制剂。一些已知同时具有抑制拓扑异构酶 I 和拓扑异构酶 II 活性的化合物被用作拓扑异构酶 I / II 抑制剂。

优先用于本发明的拓扑异构酶 I 抑制剂为喜树碱及其类似物。喜树碱是最初从中国植物喜树的木和树皮中分离出来的五元环生物碱 (Wall, M. E. 等。 *J. Am. Chem. Soc.*, 94:388 (1996))。喜树碱由于不可逆转地抑制拓扑异构酶 I 活性而表现出药理学作用。喜树碱及其类似物或衍生物的合成方法已属已知，并被总结和罗列于 US5244903 中，在此引入作为参考。

喜树碱的类似物包括 SN-38 ((+)-(4S)-4, 11-二乙基-4, 9-二羟基-1H-

吡喃并[3', 4':6, 7]-中氮茚并[1, 2-b] 喹啉-3, 14(4H, 12H)-二酮；9-氨基喜树碱；拓扑替康(hycamtin, 9-二甲基-氨基甲基-10-羟基喜树碱)；伊立替康(CPT-11, 7-乙基-10-[4-(1-哌啶)-1-哌啶]-羧基氨基-喜树碱)，在体内水解为 SN-38)；7-乙基喜树碱及其衍生物 (Sawada, S. 等 *Chem. Pharm. Bull.*, 41(2):310-313 (1993))；7-氯甲基-10, 11-亚甲基-二氧基-喜树碱；及其他(SN-22, Kunimoto, T. 等. *J. Pharmacobiodyn.*, 10(3): 148-151(1987)；N-甲酰氨基-12, 13, 二氢-1, -11 二羟基-13-(β -D-吡喃葡萄糖)-5H-吲哚[2, 3-a]吡咯并[3, 4-c]咔唑-5, 7(6H)-二酮(NB-506, Kanzawa, F. 等. *Cancer Res.*, 55(13): 2806-2813(1995)；DX-8951f 和 lurtotecan(GG-211 或 7-(4-甲基哌嗪-亚甲基)-10, 11-亚乙二氧基-20(S)-喜树碱)(Rothenberg, M. L., 等. *Ann. Oncol.*, 8(9): 837-855(1997))和 7-(2-N-异丙基氨基)乙基)-(20S)-喜树碱 (CKD602, Chong Kun Dang 公司, 韩国)。

同时具有抑制拓扑异构酶 I 和拓扑异构酶 II 活性的拓扑异构酶抑制剂包括 6-[[2-(二甲基氨基)-乙基]氨基]-3-羟基-7H-茚并[2, 1-c]喹啉-7-酮二盐酸化物, (TAS-103, Utsugi, t., 等. *Jpn. J. Cancer Res.*, 88(10)992-1002))和 3-甲氧基-11H-吡啶并[3', 4'-4, 5]吡咯[3, 2-c]喹啉-1, 4-二酮(AzalQD, Riou, J. F., 等. *Mol. Pharmacol.*, 40(5):699-706(1991)).

在本发明的一个实施方案中，用于给药的拓扑异构酶 I 抑制剂是具有一个手性中心的喜树碱类似物的药理活性对映体。可使用本领域技术人员已知的技术从外消旋混合物中拆分对映体。

C. 脂质体组合物的制备方法

脂质体可以通过许多技术制备，如 Szoka, F., Jr., 等在 *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9:467(1980) 中描述的，下面将描述支持本发明脂质体制备的特定实施例。典型地，脂质体为用简单脂质膜水合技术制备的多室小囊(MLVs)。在这种方法中，形成脂质体的类脂和包括一种亲水性聚合物衍生化的可成囊类脂的混合物溶解于适宜的溶剂中，在容器中蒸

发溶剂后形成干薄膜。然后加水性介质将膜覆盖形成 MLVs，典型地大小为 0.1-10 微米。用于制备衍生化类脂和形成聚合物包衣脂质体的示例方法见共同拥有的 US5013556、5631018 和 5395619，在此引入作为参考。

通过标准方法选择可以结合到脂质体上的治疗药物，包括 (i) 用药物的水性溶液水合脂质膜被动包封水溶性化合物，(ii) 水合含有药物的脂质膜被动包封亲脂性化合物，和 (iii) 靠脂质体内/外离子梯度负载具电离性质的药物，术语为“遥控载药法”。其他制备方法如逆向蒸发相脂质体法也适用。

本发明优选采用遥控载药法制备脂质体。在为支持本发明而进行的研究中，靠离子浓度梯度采用遥控载药法将三种示例性的拓扑异构酶 I 抑制剂负载到预先形成的脂质体中，如先有技术 US 5192549 中描述和如实施例 1 描述。与其他负载方法相比，遥控载药法制得的脂质体中央室积聚的药物浓度要高。在本发明的一个优选实施方案中，至少约 0.10 微摩尔药物/微摩尔类脂、更优选至少约 0.15 微摩尔药物/微摩尔类脂、最优选至少约 0.20 微摩尔药物/微摩尔类脂的拓扑异构酶 I 抑制剂或拓扑异构酶 I / II 抑制剂负载到脂质体中。支持本发明的脂质体包含 MPE-喜树碱、拓扑替康或 CKD602。如实施例 1 将要讨论的，通过遥控载药法负载到脂质体中的这些化合物的浓度大于 0.20 微摩尔药物/微摩尔类脂（参见实施例 1 的表）。

用于遥控载药的具有跨脂质体双层的离子梯度的脂质体可通过许多技术制备。上面描述了一个典型方法，其中可形成脂质体的类脂混合物溶于适宜的有机溶剂中并在容器中蒸发形成薄膜。然后用含有将在脂质体内部空间形成水相的溶质的水性介质覆盖形成的薄膜。

脂质体形成后，采用已知技术将囊泡成粒 (sizing) (按一定尺寸制造) 而获得所需粒度范围的脂质体。优选脂质体被均匀地制成粒径为 0.04-0.25 微米。采用超声或均化处理脂质体可制得典型粒径为 0.04-0.08 微米的小单层脂质体 (SUVs)。采用膜挤压法即将脂质体通过 0.03-0.5 微米、典型地 0.05、0.08、0.1 或 0.2 微米的聚碳酸酯膜或其他有确定孔径的膜，可以制得粒径为约 0.08-0.4 微米的均匀脂质体。膜的孔径

与通过挤压过膜生成的脂质体最大粒径大约相符，特别是当制备物被两次或多次挤压过同样的膜的情况下更是如此。成粒优选在用于脂质水合的原始缓冲液中进行，这样在制备过程中脂质体的内相始终保留有这种介质。

成粒后，处理脂质体的外部介质以产生跨脂质体膜离子梯度，典型地为内低/外高的浓度梯度。多种方法可达到这个目的，例如(i)稀释外部介质，(ii)对所需的最终介质透析，(iii)用所需介质通过分子筛色谱如 Sephadex G-50，或(iv)高速离心后再将沉淀的脂质体混悬于所需的最终介质中。目前认识到外部介质的选择取决于梯度形成的机理和所需的外部 pH 值。

在产生离子梯度的最简单方法中，水合、成粒的脂质体有一个选择的内部介质 pH 值。滴定脂质体混悬液，或用具有所需外部 pH 值的缓冲液按上述方法交换外相缓冲液直至达到所需的最终 pH 值。例如，象谷氨酸或磷酸缓冲液这样的所选择的缓冲液中原始介质的 pH 值为 5.5，而最终外部介质为 pH 值 8.5 的相同或不同缓冲液。优选含有大致相同克分子渗透压浓度的内部和外部介质，例如对缓冲液、盐或低分子量溶质如蔗糖浓度适当地调节。

另一个方法中，通过在脂质体中包含一种所选择的离子载体来产生梯度。为了说明，在钾缓冲液中制备在脂质体双层中含有缬氨霉素的脂质体，成粒，然后用钠缓冲液交换，产生一个内部钾/外部钠的梯度。钾离子由内向外的移动相应地产生了一个内部低/外部高 pH 的梯度，推测这是对应于净负电荷穿过脂质膜而产生的质子向脂质体移动 (Deamer, 等。1972)。

在另一个更优选的方法中，是通过建立一个跨脂质体膜的铵离子梯度以产生用于药物负载的质子梯度，如 US5192549 中所述。这里的脂质体在含有铵盐的水性缓冲液中制备，典型地为 0.1-0.3M 的铵盐如硫酸铵，合适的 pH 值如 5.5-7.5。可用硫酸化的聚合物来产生梯度，如右旋糖酐硫酸铵或硫酸肝素。脂质体形成和成粒后，用不含铵离子的介质交换外部介质，例如同样的缓冲液，但是其中的硫酸铵被能与脂质体保持相同

内外克分子渗透压浓度的氯化钠或糖代替。

脂质体形成后，脂质体内部的铵离子与氨和质子达到平衡。氨能够渗透脂质双层并从脂质体内部逸出。氨的不断逸出使脂质体内的平衡向产生质子的正平衡移动。

通过将药物加入到具离子梯度的脂质体混悬液中使拓扑异构酶抑制剂负载到脂质体中，在确保化合物能有效地由外部介质进入脂质体中的条件下处理混悬液。适合药物负载的温育条件如下 (i) 允许衍生的化合物以一种不带电的形式扩散至脂质体，和 (ii) 优选达到较高的药物负载浓度，如包封药物 5-500mM、更优选 20-200mM、最优选 50-300 mM。

优选在高于脂质体类脂相变温度的温度下进行负载。因此，对于主要由饱和磷脂形成的脂质体，负载温度可在 60°C 或更高。典型地负载时间为 15-200 分钟，这取决于药物对脂质体双层膜的渗透性、温度和脂质体类脂与药物的相对浓度。

通过对脂质体浓度、所加化合物的外部浓度和离子梯度的适当选择，基本上所有的化合物均可负载入脂质体。例如，3 个 pH 单位的梯度(或采用铵离子梯度的这样的梯度强度)即可使药物的最终内外浓度比约为 1000:1。已知计算的内部脂质体体积和所负载药物的最大浓度，就可对外部介质中药物的量加以选择，这样药物基本能完全被负载到脂质体中。

另外，如果药物负载不能有效地消耗游离药物的外部介质，可以在药物负载后处理脂质体混悬液直至除去未包封的药物。游离药物也可通过如分子筛色谱、渗析或离心方法除去。

在其他实施方案中，拓扑异构酶抑制剂负载到预先形成的脂质体中，该脂质体内部含有能与拓扑异构酶抑制剂有效混合并提高化合物在脂质体中保留的截留剂 (trapping agent)。在优选的实施方案中，截留剂是一种多阴离子聚合物，例如优选含有相似化学结构和电离基团的重复单元的分子，即可电离产生离子电荷、优选为负电荷的化学官能团。分子量 400-2,000,000 道尔顿的聚合物均适宜。

多阴离子聚合物在脂质囊泡形成过程中被包封到脂质体中。在将药物负载到预先形成的脂质体中的过程中，聚合物用来将药物截留或保留

在脂质体内。在此描述的研究中，右旋糖酐硫酸盐用作典型的多阴离子聚合物。右旋糖酐硫酸盐是大约 2.3 个硫酸根基团/葡糖残基的葡糖酐聚合物。它含有大约 95% 的 α -D-(1-6) 键和使右旋糖酐分支的剩余(1-3)键。容易获得分子量为 5,000-500,000 道尔顿的聚合物。然而，其他合适的聚合物还包括硫酸化、磷酸化、羧基化或磷酸化的亲水聚合物。例如，硫酸蛋白多糖如硫酸肝素，硫酸多糖如硫酸纤维素或纤维素衍生物、角叉菜胶、粘蛋白，硫酸化多肽如带硫酸化氨基的多溶素、带有磷酸衍生物化糖或肽亚单位的糖肽、和透明质酸。也包括硫酸软骨素 A、B 和 C、硫酸角蛋白、硫酸皮肤素。聚合物也可以是修饰成包括阴离子官能团的中性聚合物。例如，直链淀粉、果胶、支链淀粉、纤维素和修饰成包括阴离子亚单位的右旋糖酐。带有磺基的聚合物如聚乙烯硫酸、聚乙烯磺酸、聚苯乙烯磺酸和硫酸松香树胶也是合适的。

制备含有截留剂的脂质体在实施例 4 中有所描述。在该实施例中，通过将脂质体类脂溶于乙醇后加到右旋糖酐硫酸铵盐溶液中，混合形成包封有右旋糖酐硫酸铵盐的脂质体，这样多阴离子聚合物硫酸右旋糖酐就被包封在脂质体中。通过交换外部介质形成用于遥控载药的跨脂质体铵离子梯度。

III. 组合物体内给药

如实施例 1 所示制备支持本发明的脂质体。在硫酸铵盐离子浓度梯度下，将拓扑异构酶 I 抑制剂 (7-(4-甲基哌嗪)-亚甲基)-10,11-亚乙二氧基-20(S)-喜树碱，在此指“MPE-喜树碱”；拓扑替康；和 7-(2-(N-异丙基氨基)乙基)-(20S)-喜树碱，在此指“CKD-602”负载到脂质体中。脂质体由摩尔比为 55.4:39:5.6 的氢化大豆卵磷脂、胆固醇和聚乙二醇衍生化的二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(PEG-DSPE)组成。实施例 1 中的表总结了制备脂质体制剂的药物与类脂之比。根据挤出脂质体的捕获容积为 0.9 微升/微摩尔类脂，计算出脂质体中三种化合物的浓度：MPE-喜树碱为 284 mM，拓扑替康为 264 mM 和 CKD-602 为 298 mM。根据挤出脂质体的捕获容积为 1.5 微升/微摩尔类脂，计算出脂质体中药物的浓度：MPE-喜树碱

为 189 mM, 拓扑替康为 174 mM 和 CKD-602 为 198 mM. 下面将描述每种药物的体内研究。

1. MPE-喜树碱的体内给药

长循环即 PEG 包衣的含有 MPE-喜树碱的脂质体给予大鼠, 并测定脂质体包封形式的药物的血液循环时间。脂质体包封的药物和游离药物的药代动力学曲线见图 1A, 以注射剂量的百分比为时间的函数。可以看出, 脂质体包封形式的拓扑异构酶 I 抑制剂(实心圆)的血液循环时间明显长于游离形式的药物(实心方形)。对于 MPE-喜树碱来说, 脂质体包封药物的血液循环半衰期为 14 小时, 而游离药物的半衰期为 50 分钟。与游离药物相比, 脂质体包封药物的大鼠血液清除率大约低 35 倍, 曲线下的面积大约高 1250 倍。分析结果显示, 在血流中基本上所有的药物均保留在脂质体中。

图 1B 显示给予大鼠脂质体制剂(实心圆)和游离药物后全血中 MPE-喜树碱的浓度。长循环时间导致血液中的药物浓度高。

采用异种移植肿瘤模型测定了 MPE-喜树碱脂质体制剂的抗肿瘤效率, 其中纯种裸鼠被接种人结肠肿瘤细胞 HT29. 惊奇的是, 毒性和抗肿瘤效果的研究表明: 与同等剂量的游离药物相比, MPE-喜树碱脂质体毒性明显要高。下面将描述实验及其结果。

如实施例 1 制备脂质体包封的 MPE-喜树碱。给予携带 HT-29 结肠异种移植的裸鼠 24mg/kg、15mg/kg 和 6 mg/kg 剂量的脂质体包封的 MPE-喜树碱或相同剂量的游离药物。肿瘤接种 10 天后开始治疗并在第 10、16 和 23 天给药。测量治疗期间和之后每只动物的肿瘤体积, 如实施例 2 所述。

每只实验动物的体重和肿瘤体积分别见图 2A 和 2B, 其中治疗时给予脂质体包封的 MPE-喜树碱 24mg/kg(实心圆)、15mg/kg(实心三角)和 6mg/kg(实心方形)及游离 MPE-喜树碱 24mg/kg(空心圆)、15mg/kg(空心三角)和 6mg/kg(空心方形)。

给予脂质体包封的 MPE-喜树碱治疗的动物中, 15mg/kg 和 24mg/kg

剂量组的所有动物均在两次剂量之后死于与药物相关的毒性，大部分在第一次给药 5 天后死亡。6mg/kg 剂量组的动物在第 23 天的第三次给药之后依然存活，在以后的几天内十只中有五只死亡。脂质体包封的 MPE-喜树碱毒性表现为动物体重的严重下降，如图 2A 所示。

作为对照，给予游离药物治疗的所有动物均存活，只有 24mg/kg 剂量组中的一只在第 23 天的第三次给药几天后死亡。

表 1

治疗	剂量 mg/kg	实验动 物数	动物存活数		
			第 1 次剂量后 (第 9 天)	第 2 次剂量后 (第 16 天)	第 3 次剂量后 (第 23 天)
生理盐水	na	20	20	20	20
游离 MPE-喜树碱	24	10	10	10	9
游离 MPE-喜树碱	15	10	10	10	10
游离 MPE-喜树碱	6	10	10	10	10
脂质体包封的	24	10	1	0	0
脂质体包封的	15	10	5	0	0
脂质体包封的	6	10	10	10	5

至于制剂的抗肿瘤活性，若不考虑其较大毒性，脂质体包封的 MPE-喜树碱与游离药物相比能更有效地抑制肿瘤生长。由图 2B 可见，在抑制肿瘤生长方面，6mg/kg 剂量的脂质体包封的 MPE-喜树碱(对数生长率为 -0.026)比最大剂量的游离 MPE-喜树碱(24mg/kg，对数生长率为 0.0048)明显有效。

监测实验动物肿瘤的全部或部分缓解状况，结果见表 2。肿瘤的完全缓解定义为在实验结束时肿块消失。部分缓解定义为动物个体肿瘤体积小于最大肿瘤体积的 50%。

表 2

治疗	剂量 mg/kg	完全缓解 ¹	部分缓解 ²
生理盐水		0/20	0/20
游离 MPE-喜树碱	24	3/10	1/10
游离 MPE-喜树碱	15	2/10	0/10
游离 MPE-喜树碱	6	0/10	0/10
脂质体包封的	24	- ³	- ³
脂质体包封的	15	- ³	- ³
脂质体包封的	6	10/10	na ⁴

¹ 全部缓解表示实验结束时肿块消失。

² 部分缓解表示个体动物肿瘤体积小于最大肿瘤体积的 50%。

³ 实验组的十只动物全部在第 16 天的第二次给药后死亡。

⁴ na=不适用

如表 2 所示, 6mg/kg 剂量的脂质体包封的 MPE-喜树碱能有效地使实验组十只动物的肿瘤全部缓解。在第 16 天的第二次给药后的五天内可观察到这个效果。如上述提到的, 6mg/kg 剂量脂质体包封药物的给药组中的五只动物在第三次给药后很快死亡。直至实验结束之后(大约在第 23 天最后一次治疗后的 30 天), 五只存活动物的肿瘤未复发。15mg/kg 和 24mg/kg 脂质体包封的 MPE-喜树碱给药组的动物数据未提供, 因为所有的动物均死于与药物有关的毒性, 如上所示。

如表 2 所示, 24mg/kg 游离 MPE-喜树碱给药组中有 3 只动物的肿瘤全部缓解, 1 只部分缓解。

比较药物以游离形式和脂质体形式给药的结果显示: 以脂质体包封的形式给药更有效。实际上, 通过比较给予 6mg/kg 脂质体包封的 MPE-喜树碱和 24mg/kg 游离 MPE-喜树碱的结果可见(图 2B, 表 2), 脂质体包封药物的效力至少是游离药物的四倍。结果也清晰表明: 有效抗肿瘤治疗所需的剂量, 脂质体包封的 MPE-喜树碱要比游离药物低四倍。

实施例 2 详细描述了用以确定脂质体包封的 MPE-喜树碱的最大耐受剂量和最小有效剂量的另一个研究。在这个研究里，按实施例 1 所述制备脂质体，按 0.1 mg/ml、0.5 mg/ml、1 mg/ml、3 mg/ml 和 5 mg/ml 的剂量给予实验动物脂质体制剂。游离药物以 20 mg/ml 剂量给药作为对照。

表 3 总结了每组的实验动物数，详细说明了在每个剂量不同阶段动物的存活数。从表中可见，所有给予生理盐水治疗的对照组和所有给予游离 MPE-喜树碱治疗的动物在研究期间均存活。5mg/kg 脂质体包封的 MPE-喜树碱给药组的十只动物中有四只死于与药物相关的毒性，一只在第三次给药后死因不详。3mg/kg 脂质体包封的 MPE-喜树碱给药组的十只动物中有一只在第二次给药后死亡，由于缺少任何相应的毒性迹象而未归因于药物所致。其他组给予脂质体包封 MPE-喜树碱治疗的动物在整个实验期间均存活。

表 3

治疗	剂量 mg/kg	实验动 物数	动物存活数		
			第 1 次剂量后 (第 9 天)	第 2 次剂量后 (第 16 天)	第 3 次剂量后 (第 23 天)
生理盐水		20	20	20	20
游离 MPE-喜树碱	20	10	10	10	10
脂质体包封的	5	10	10	10	5
脂质体包封的	3	10	10	9	9
脂质体包封的	1	10	10	10	10
脂质体包封的	0.5	10	10	10	10
脂质体包封的	0.1	10	10	10	10

研究结果见图 3A-3B，其中 3A 显示了鼠的体重(g)随接种 HT-29 结肠肿瘤后天数的变化。在接种后的第 9、16 和 23 天给予动物 5mg/kg(空心三角)、3mg/kg(空心的倒三角)、1mg/kg(空心菱形)、0.5mg/kg(空心圆形)和 0.1mg/kg(空心方形) 脂质体包封的拓扑异构酶 I 抑制剂和 20mg/kg(实心方形) 游离药物。如图 3A 所示，体重的变化与剂量有关，

并且这些变化与观察到的毒性相关。

图 3B 显示肿瘤体积 (mm^3) 随接种肿瘤后天数变化的曲线, 其中剂量符号与图 3A 中一致。图 3B 显示: 与 $20\text{mg}/\text{kg}$ 游离药物相比, $5\text{mg}/\text{kg}$ 和 $3\text{mg}/\text{kg}$ 脂质体包封的 MPE-喜树碱均能更有效地抑制肿瘤生长。给予 $20\text{mg}/\text{kg}$ 游离 MPE-喜树碱 (0.011 的对数生长率) 进行治疗的抗肿瘤活性与 $1\text{mg}/\text{kg}$ 脂质体包封的药物形式 (0.017 对数生长率) 大致相同。

表 4 概述了实验动物的全部和部分肿瘤的缓解。

表 4

治疗	剂量 mg/kg	完全缓解 ¹	部分缓解 ²
生理盐水		0/20	0/20
游离 MPE-喜树碱	20	0/10	1/10
脂质体包封的 MPE-喜树碱	5	10/10	na ³
脂质体包封的 MPE-喜树碱	3	7/10	1/10
脂质体包封的 MPE-喜树碱	1	0/10	0/10
脂质体包封的 MPE-喜树碱	0.5	0/10	1/10
脂质体包封的 MPE-喜树碱	0.1	0/10	0/10

¹ 全部缓解表示实验结束后肿瘤消失。

² 部分缓解表示个体动物肿瘤体积小于最大肿瘤体积的 50%。

³ na=不适用

给予 $20\text{mg}/\text{kg}$ 游离 MPE-喜树碱治疗的动物的肿瘤没有达到全部缓解。相反地, $5\text{mg}/\text{kg}$ 脂质体包封的 MPE-喜树碱给药组的十只动物均表现全部缓解, $3\text{mg}/\text{kg}$ 剂量给药组的十只动物中的七只出现全部缓解。

实施例 3 的研究结果表明: 脂质体包封的拓扑异构酶抑制剂 MPE-喜树碱的抗肿瘤活性明显好于对比的游离药物组, 由于 $20\text{mg}/\text{kg}$ 游离药物的抗肿瘤活性与 $1\text{mg}/\text{kg}$ 脂质体包封的药物相当, 这表明脂质体包封的药物的抗肿瘤效力是游离药物的约 20 倍。 $3\text{mg}/\text{kg}$ 和 $5\text{mg}/\text{kg}$ 脂质体包封的 MPE-喜树碱在肿瘤治疗中比 $20\text{mg}/\text{kg}$ 游离药物明显更有效, 这表明脂质

体包封药物的治疗指数比游离药物大约高出 4-5 倍。

2. 拓扑替康的体内给药

在支持本发明的另一个研究中，按实施例 4 将拓扑替康包封到由 95:5 摩尔比的 DSPC 和 mPEG-DSPC 组成的脂质体中。这里没有提及的早期研究表明：拓扑替康不易保留在脂质体中。脂质双层选用单组分磷脂，该磷脂的酰基链长度接近于 mPEG-DSPC 组分中的 DSPC。该双层具有最小的排列缺陷，排列缺陷可引起固相双层中最相邻接触的不完善，所述固相双层的侧向和旋转流动性比液态双层低。另外，可采用荷电的右旋糖苷硫酸盐使拓扑替康沉积于脂质体内部。其他的聚合物，尤其是多阴离子聚合物如硫酸软骨素 A，聚乙烯硫酸和多磷酸也适用于此。

按实施例 4 所述，将拓扑替康负载到预先形成的中央间室包含右旋糖苷硫酸铵的脂质体中。负载之后，过滤除去未包封的药物并定性脂质体。负载脂质体至药物/类脂比为 0.238，脂质体平均粒径为 87nm。

静脉给予大鼠含有拓扑替康的脂质体以确定血液循环时间。图 4A-4B 显示给药后鼠血浆中拓扑替康的浓度随时间的变化。图 4A 比较了给予相同的 2mg/kg 剂量后包封拓扑替康脂质体（实心三角形）和游离拓扑替康（实心方形）的浓度。图 4B 比较了给予 5 mg/kg 剂量的两种形式药物。计算的药动学参数见表 5。

表 5

参数	剂量=2mg/kg		剂量=5mg/kg	
	游离拓扑替康	脂质体包封的	游离拓扑替康	脂质体包封的
Plasma C _{max} (μg/mL)	2.89	54.5	8.23	119.3
AUC (μg·mL·h)	0.57	523	1.57	1140
T 1/2 (h)	0.20	7.2	0.30	9.8
CL (mL/h)	887	0.96	820	1.10
Vol. Dist. (mL)	173	9.2	278	17.5
清除速率常数 (1/h)	3.45	0.096	2.33	0.071

表 5 的数据显示，脂质体包封药物的循环时间明显长于游离药物。

在另一研究中测定了脂质体的效力。如实施例 4 描述，向皮下异种移植肿瘤的鼠施用脂质体。荷瘤鼠随机分为六个治疗组，每组十二只，每只治疗如下：生理盐水，4 mg/kg 脂质体包封的 MPE-喜树碱；25 mg/kg 游离拓扑替康；2 mg/kg、5 mg/kg 和 8 mg/kg 脂质体包封的拓扑替康。所有治疗均每周一次进行三次静脉浓注给药，具体为第 9、16 和 23 天。

在评估治疗有效性的研究期间每周两次测定每只动物的肿瘤大小。每周两次检测动物体重以评估制剂的毒性。结果见表 6 和 7 并见图 5A-5B。

表 6

治疗	剂量 mg/kg	完全缓解 ¹	部分缓解 ²	无效应 ³
生理盐水		0	0	12
脂质体包封的 MPE-喜树碱	4	8	4	0
游离拓扑替康	25	0	1	11
脂质体包封的拓扑替康	2	1	2	9
脂质体包封的拓扑替康	5	2	8	2
脂质体包封的拓扑替康	8	7	3	2

¹全部缓解表示实验结束时肿瘤消失。

²部分缓解表示个体动物肿瘤体积小于最大肿瘤体积的 50%。

³无效应表示肿瘤与最初肿瘤体积相同。

如图 5A 和表 6 所示，未经治疗的肿瘤在实验期间每天以 17.8 mm^3 的速率增长。给予脂质体包封的 MPE-喜树碱的动物（阳性对照组）的肿瘤在实验期间增长速率为 $-1.2 \text{ mm}^3/\text{天}$ 。以低于 40mg/kg 最大耐受量 (MTD) 的 25mg/kg 的剂量给予未包封的拓扑替康，动物的肿瘤增长速率为 $14.1 \text{ mm}^3/\text{天}$ 。给予脂质体包封的拓扑替康治疗的动物，其中 2mg/kg 剂量组在实验期间肿瘤增长速率为 $0.9 \text{ mm}^3/\text{天}$ ，5mg/kg 剂量组的肿瘤增长速率为 $-1.9 \text{ mm}^3/\text{天}$ ，8mg/kg 剂量组的增长速率为 $-0.8 \text{ mm}^3/\text{天}$ 。负增长速率表示肿瘤大小退化至低于初始的肿瘤体积。

计算所有治疗组的治疗肿瘤与对照组肿瘤的大小比例 (%T/C)，结果见表 6。国家癌症研究院定义：%T/C 低于 42 时有显著的抗肿瘤活性。

表 7

治疗	剂量 mg/kg	%T/C ¹ 第 29 天	%T/C 第 33 天	%T/C 第 36 天
脂质体包封的 MPE-喜树碱	4	1.8	0.6	1.9
游离拓扑替康	25	82.8	79.0	85.9
脂质体包封的拓扑替康	2	19.5	12.9	16.3
脂质体包封的拓扑替康	5	10.5	5.6	5.6
脂质体包封的拓扑替康	8	2.0	2.2	2.2

¹%T/C 定义为所显示各天的平均肿瘤体积与生理盐水处理的对照组动物的平均肿瘤体积的比值。

3. CKD-602 的体内给药

实施例 5 描述了采用拓扑异构酶抑制剂 CKD-602 的旨在支持本发明的另一研究。采用以右旋糖酐为截留剂的硫酸铵盐梯度将药物遥控载药入脂质体中。与采用拓扑替康所进行的研究一样，脂质体类脂组合物 HSPC 和 mPEG-DSPE 的摩尔比率为 95/5。

图 6 图显示给予大鼠 1mg/kg CKD-602 后 CKD-602 血浆浓度随时间的变化曲线。计算出脂质体包封形式药物（实心圆）的半衰期为 9.8 小时并且 AUC 为 274 μg/mL/小时。而计算的游离形式药物半衰期为 0.2 小时、AUC 为 0.37 μg/mL/小时。

用荷有 HT-20 结肠癌异种移植物的小鼠评估 CKD-602 制剂的治疗效力。72 只接种了 HT-20 肿瘤细胞的小鼠随机分为六个治疗组。每组动物给予下述一种制剂治疗：生理盐水，4mg/kg 脂质体包封的 MPE-喜树碱；20mg/kg 游离的 CKD-602；1mg/kg、2mg/kg 和 4mg/kg 脂质体包封的 CKD-602。所有治疗均每周一次进行三次静脉浓注，具体在第 11、18 和 25 天。

在研究评估治疗效力期间每周两次测定每只动物的肿瘤大小。每周两次检测动物体重以评估制剂的毒性。结果见表 8 和 9 及图 7A-7B。

表 8

治疗	剂量 mg/kg	完全缓解 ¹	部分缓解 ²	无效应 ³
生理盐水		0/10	0/10	10/10
脂质体包封的 MPE-喜树碱	4	6/10	0/10	4/10
游离 CKD602	20	0/6	0/6	6/6
脂质体包封的 CKD602	1	2/10	7/10	1/10
脂质体包封的 CKD602	2	6/10	2/10	2/10
脂质体包封的 CKD602	4	4/4	0/4	0/4

¹全部缓解表示实验结束后肿瘤消失。

²部分缓解表示个体动物肿瘤体积小于最大肿瘤体积的 50%。

³无效应表示肿瘤大小等于或大于最初肿瘤体积。

如表 8 和图 7B 所示: 在研究期间, 生理盐水组动物的肿瘤以 $15.45 \text{ mm}^3/\text{天}$ 的速率持续增长。脂质体包封的 MPE-喜树碱治疗的动物阳性对照组肿瘤以 $-0.63 \text{ mm}^3/\text{天}$ 的速率增长。游离的未包封的 CKD 602 组动物肿瘤以 $15.21 \text{ mm}^3/\text{天}$ 的速率增长。脂质体包封的 CKD 602 治疗的动物中剂量为 1 mg/kg 的组肿瘤以 $-2.21 \text{ mm}^3/\text{天}$ 的速率增长, 剂量为 2 mg/kg 的组肿瘤以 $-0.96 \text{ mm}^3/\text{天}$ 的速率增长, 剂量为 4 mg/kg 的组肿瘤以 $-2.37 \text{ mm}^3/\text{天}$ 的速率增长。负增长速率表示肿瘤大小退化至低于初始的肿瘤体积。

计算所有治疗组的治疗肿瘤与对照组肿瘤的大小比例 (%T/C), 结果见表 9。国家癌症研究院定义: %T/C 低于 42 时有显著的抗肿瘤活性。

表 9

治疗	剂量 mg/kg	%T/C ¹ 第 29 天	%T/C 第 33 天	%T/C 第 36 天
脂质体包封的 MPE-喜树碱	4	2.9	2.3	1.6
游离 CKD602	20	129.1	120.1	99.9
脂质体包封的 CKD602	1	11.4	7.7	4.4
脂质体包封的 CKD602	2	4.8	2.8	1.6
脂质体包封的 CKD602	4	1.0	1.3	0.9

¹ %T/C 定义为所显示各天的平均肿瘤体积与生理盐水对照组的动物的平均肿瘤体积的比值。

IV. 实施例

下述实施例用以说明本发明组合物的制备、特征化和使用方法，但不以任何方式限制本发明的范围。

材料

拓扑异构酶抑制剂 (7-(4-甲基哌嗪亚甲基)-10,11-亚乙二氧基-20(S)-喜树碱三氟乙酸盐 (GI147211) (MPE-喜树碱)，由 Glaxo 研究所，Research Triangle Park, NC 提供。CKD602 (7-(2-N-异丙基氨基)乙基)-(20S)-喜树碱) 由 Chong Kun Dang 公司，韩国提供。拓扑替康 (Hycamtin[®]) 由市售购得。

脂质体的制备材料和其他试剂均由市售获得。

方法

动物研究: Homozygous 裸鼠来自 Taconic Farms (Germantown, NY) 并在实验之前用 7 天适应环境。动物放在配有无菌啮齿类动物食物和酸化水及 12: 12 昼/夜循环的隔离笼中。动物在接种肿瘤之前根据体重随机分组。

肿瘤: 采用片段套针植入技术 (trachar placement) 将供体动物体内快速生长的肿瘤接种。用人结肠癌细胞系 HT-29 引发皮下异种移植肿瘤。培养的细胞经胰蛋白酶处理、洗涤、计数并再混悬于 5×10^7 细胞/ml 的正常培养基中。肿瘤接种通过在颈背部注射 0.1ml (5×10^6 细胞) 来完成。在开始治疗前让肿瘤长到平均 100 mm^3 大小。

监测: 每天都要观察所有动物的生长状况。动物在肿瘤接种前和以后每周要称重。接种后 5-10 天开始，在整个实验过程中每周测量两次肿瘤大小。任何与开始体重相比下降 15% 或以上的和肿瘤体积大于 4000 mm^3

的动物均不能用于研究。

实施例 1

包封拓扑异构酶抑制剂的脂质体的制备

脂质体的制备及所选拓扑异构酶的负载如下所述。

A. 脂质体制备

类脂氢化大豆卵磷脂 (HEPC)、胆固醇 (Chol) 和 mPEG-DSPE (比例为 56.4:38.3:5.3 摩尔/摩尔) 于 65°C 溶于在 250 ml 圆底烧瓶中的乙醇中。于 65°C 连续搅拌至少 30 分钟。乙醇中类脂的总浓度为 3.7 g 总类脂/10ml 乙醇。

溶解的类脂溶液转移到含 100 ml 浓度为 250 mM 的硫酸铵溶液 (平衡至 65°C) 的 250 ml 圆底烧瓶中。于 65°C 水浴中连续混合乙醇: 类脂: 硫酸铵的水合混合物至少 1 小时形成乙醇水合的寡层 (oligolamellar) 脂质体。

采用 Lipex 热筒挤出机使水合混合物通过已知孔径的聚碳酸酯膜以降低寡层脂质体的粒径。混合物通过 0.20 μ m 孔径的膜 5 次, 通过 0.10 μ m 孔径的膜 10 次。挤出的脂质体的内部含水间室 (一或多个) 含硫酸铵, 它们混悬于其中的外部含水体相介质中也有。经过成粒的脂质体贮存在冰箱中直到遥控载药前的渗滤处理。

100 mg 所选的拓扑异构酶抑制剂 MPE-喜树碱、CKD-602 或拓扑替康溶于 40 ml 10% 的蔗糖溶液中形成一个 2.5mg/ml 的浓度。溶解后, 溶液通过 0.20 μ m 的膜除去不溶性颗粒。

B. 脂质体的遥控载药

硫酸铵和乙醇在遥控载药之前用标示分子量为 100Kda 的截留筒通过中空纤维切流渗滤法从外部含水体相中除去。维持恒定进样体积, 并且至少采用七个交换体积使脂质体混悬在含 10% 蔗糖的外部水相中。

渗滤后, 脂质体与药物以 (药物溶液: 脂质体) 1: 4 (v/v) 的比率混合

并迅速用预平衡的含水夹套式容器加温至 65℃。使混合物在 65℃ 的温度保持 40-60 分钟后用冰水浴迅速降温。遥控载药后，取样检查脂质体样品中存在的晶体以确定包封百分比及平均粒径。

采用可截留标示分子量为 100K 道尔顿的截留筒，通过中空纤维切流渗滤法从体相介质中除去未包封的药物。采用至少八次交换体积，才能使脂质体包封的药物混悬在含 10% 蔗糖 10 毫摩尔组氨酸 pH6.5 的外部水相中。

最终的脂质体制剂用 0.22 μ m 的醋酸纤维素酯注射滤器无菌过滤并避光冷藏直至使用。

C. 脂质体的特征化

包封百分比采用体积排阻色谱法测定，即用空体积（脂质体包封的）中的药物和药物总量（空体积加上 included 体积）之比来确定。柱子级分中的药物浓度用吸收度测定。平均粒径用准电性激光散射法测定（QELS）。在无菌过滤后测定总脂质浓度以确定药/脂比。制备并特征化负载有 MPE-喜树碱、拓扑替康和 7-(2-N-异丙基氨基)乙基)-(20S)-喜树碱 (CKD-602) 的脂质体。结果见下表。

参数	脂质体包封的 MPE-喜树碱	脂质体包封的拓扑替康	脂质体包封的 CKD-602
批号	221AZ43A	221AZ43B	221AZ53
脂质总浓度	17.81 μ mol/mL	15.97 μ mol/mL	14.079 μ mol/mL
药物浓度	2.69 mg/mL (4.55 μ mol/mL)	1.72 mg/mL (3.76 μ mol/mL)	1.77 mg/mL (3.77 μ mol/mL)
药:脂比 (mol/mol)	0.26 (1:3.92)	0.24 (1:4.25)	0.27 (1:3.73)
平均粒径	99 nm	95.4 nm	96.7 nm
包封百分率	96.4%	99.9%	95.3%

实施例 2

脂质体包封的 MPE-喜树碱的体内效力

如实施例 1 所述制备脂质体包封的 MPE-喜树碱。脂质体包封的药物和游离药物均用 5% 的右旋糖酐水溶液稀释至所需浓度。

如上面方法部分所述给裸鼠接种人结肠癌细胞系 HT-29。七十只鼠随机分为七组如下：24mg/kg、15 mg/kg 和 6 mg/kg 游离药物组；24 mg/kg、15 mg/kg 和 6 mg/kg 脂质体包封的药物组；生理盐水组。于接种后第 10 天肿瘤体积接近 75mm^3 时开始治疗。所有治疗均静脉浓注给药，每周一次，共三次，具体在第 10、16 和 23 天。

用每次实验期间和之后的肿瘤大小作为治疗效力的基本评估标准。测定体重以评估毒性。中止治疗后直至按以上标准处死期间观察荷瘤动物。当大多数对照肿瘤达到最大允许体积 (4000 mm^3) 时结束实验。

在不同的时间重复测定每只动物的肿瘤大小并作为相关的信息。因为肿瘤大小与给药后的时间有关，反复测定分析建立每次数据。通过处理数据表明对数转换相对合理。以 Y 表示肿瘤的原始测定值，设 $Z=\log(Y+1)$ 。转换数据之后，对转换的数据 Z 进行重复分析。采用 SAS 程序 PROC MIXED。评估每组的对数增长速率并比较不同治疗组间的差异。统计学上的显著性差异为 0.05，但由于是多组比较，需调整 I 型误差并且 P 值小于 0.0033 表明在任一对照之间均有显著性差异。

结果总结于表 1 和 2 和图 2A-2B。

实施例 3

脂质体包封 MPE-喜树碱剂量的研究

如实施例 1 所述制备包封有 MPE-喜树碱的脂质体。脂质体包封的药物和游离药物均用 5% 的右旋糖酐水溶液稀释至所需浓度。

如上面方法部分所述给裸鼠接种人结肠癌细胞系 HT-29。七十只鼠随机分为如下七组：0.1mg/kg、0.5 mg/kg、1 mg/kg、3mg/kg、5mg/kg 或 20 mg/kg 脂质体包封的药物；生理盐水。于接种后第 9 天肿瘤体积接近 75mm^3 时开始治疗。所有治疗均静脉浓注给药，每周一次，共三次，具体为第 10、16 和 23 天。

肿瘤大小的评估和分析如实施例 2 所述，结果见表 3 和 4 和图 3A-3B。

实施例 4脂质体包封的拓扑替康的体内效力A. 脂质体制备

如下制备包封拓扑替康的脂质体：

类脂为摩尔比 95:5 的二硬脂酰卵磷脂 (DSPC) 和 (N-(羧基-甲氧基聚乙二醇 2000)-1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺) (mPEG-DSPE)，于 70℃ 持续搅拌溶于乙醇中。乙醇液中类脂浓度为 8.9g/10mL。

以右旋糖酐硫酸钠盐为原材料经离子交换色谱制得右旋糖酐硫酸铵盐。将右旋糖酐硫酸钠盐溶于水中并用氨水调节 pH 至 5 制备 100mg/mL 的右旋糖酐硫酸铵盐溶液。

将 100mL 右旋糖酐硫酸盐溶液加热至 70℃ 并与类脂的乙醇液合并，混合形成寡层脂质体。连续搅拌一小时保持乙醇水合的寡层脂质体分散体的温度为 70℃。

水合后混合物加热至 70℃，用 Lipex 热筒挤出机通过一系列聚碳酸酯膜成粒使其平均粒径降低至约 100nm。典型地，依次通过孔径 0.2 μm 的膜 5 次，再通过孔径 0.1 μm 的膜 10 次。

在负载活性药物之前，通过用 350mM 氯化钠溶液进行八个体积交换从外部水性体相中除去未包封的右旋糖酐硫酸盐聚合物和剩余乙醇，再用 10% 蔗糖溶液进行 8 个体积交换。采用的渗滤筒可截留标示分子量为 100,000 道尔顿的物质。

在 10% 蔗糖中制备 2.5mg/mL 的拓扑替康溶液。药物溶液和渗滤脂质体按 4:1 的体积比合并，所得混合物的温度升至 70℃ 并连续搅拌一小时。然后用冰水浴迅速冷却负载后混合物以中止活性药物的负载。

用可截留标示分子量为 100,000 道尔顿的截留筒渗滤除去未包封的药物。典型地，用 10% 蔗糖 10mM 组氨酸 pH6.5 作为交换缓冲溶液进行 8-10 个体积的交换。

通过测定紫外 - 可见吸收来确定药物的浓度并将其稀释至最终浓度。

装瓶前的最后步骤包括用 $0.22\mu\text{m}$ 的滤器无菌分级过滤。

B. 脂质体的特征化

采用体积排阻色谱法测定包封百分比, 即空体积中的药物(“脂质体药物”)与从 included 和空体积中回收的总药量的比值。用紫外-可见分光光度计测定药物浓度。用准电性激光散射法测定平均粒径。用磷测定法确定总类脂量。结果见下表。

参数	脂质体包封的拓扑替康
总脂质	17.2mg/mL
总药物	2.1mg/mL
药: 脂比 (mol/mol)	0.238
平均粒径	87.3nm
包封百分比	98.8

C. 体内药动学及效力

按上述的方法部分中所述, 给 72 只小鼠接种癌细胞 HT-29。肿瘤接种九天后, 每周一次对动物进行下述方法中的一种的静脉给药治疗: 生理盐水; 4mg/kg 脂质体包封的 MPE-喜树碱; 25mg/kg 游离拓扑替康; 2mg/kg、5mg/kg 和 8mg/kg 脂质体包封的拓扑替康。所有治疗均每周一次静脉浓注, 共三次, 具体为第 9、16 和 23 天。

如实施例 2 所述评估和检测肿瘤大小, 结果见表 6 和 7 及图 5A-5B。

实施例 5

脂质体包封的 CKD-602 的体内效力

A. 脂质体的制备和特征化

除了用 CKD-602 的药物溶液外, 其他按实施例 4 所述制备含有 CKD-602 的脂质体。如实施例 4 所述测定脂质体特征, 结果如下。

参数	脂质体包封的 CKD-602
总脂质	12.5mg/mL
总药物	2.07mg/mL
药: 脂比 (mol/mol)	0.315
平均粒径	92.8nm
包封百分比	94.7

B. 体内药动学及效力

按上述的方法部分中所述，给 72 只鼠接种癌细胞 HT-29。肿瘤接种 11 天后，每周对动物进行下述方法中的一种的静脉给药治疗：生理盐水；4mg/kg 脂质体包封的 MPE-喜树碱；20mg/kg CKD-602；1mg/kg、2mg/kg 和 4mg/kg 脂质体包封的 CKD-602。所有治疗均每周一次静脉浓注，共三次，具体为第 11、18 和 25 天。

在实验期间每周两次检测每只动物的肿瘤大小以评估治疗有效量。每周两次监测每只动物的体重以评估制剂的毒性。结果见表 8 和 9 及图 7A-7B。

尽管对本发明的具体实施方案作了描述，但是本领域技术人员容易理解那些针对本发明所做的变化和修改并不偏离本发明范畴。

说 明 书 附 图

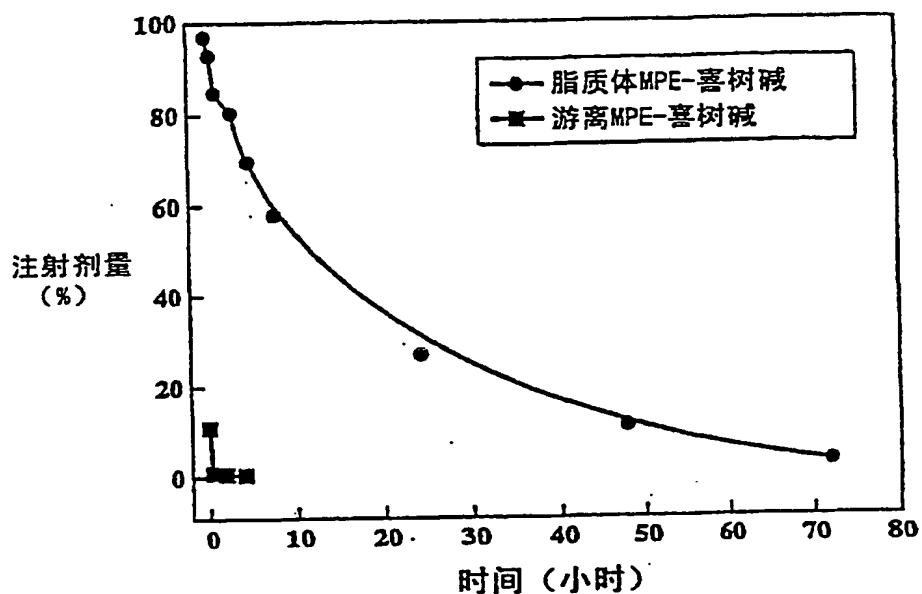


图 1A

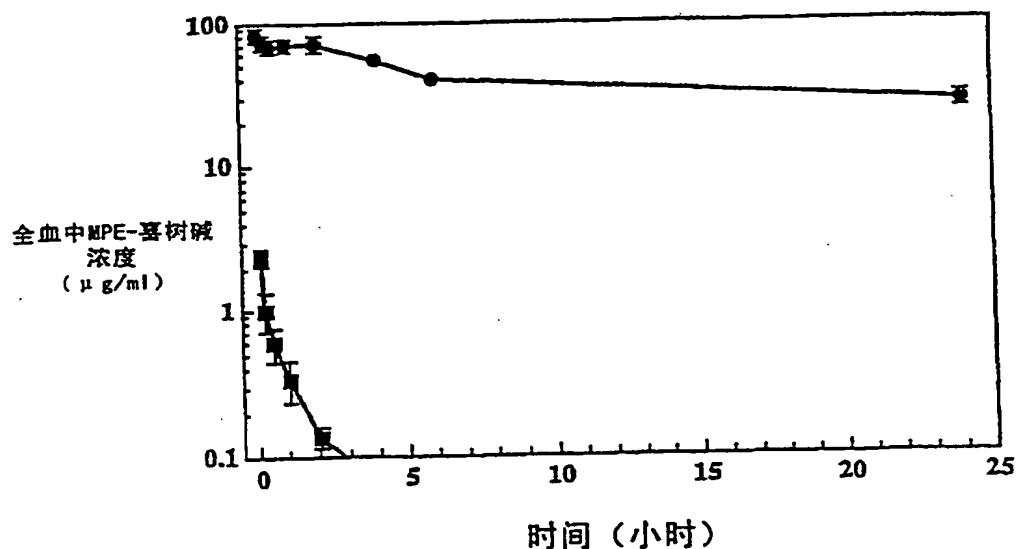


图 1B

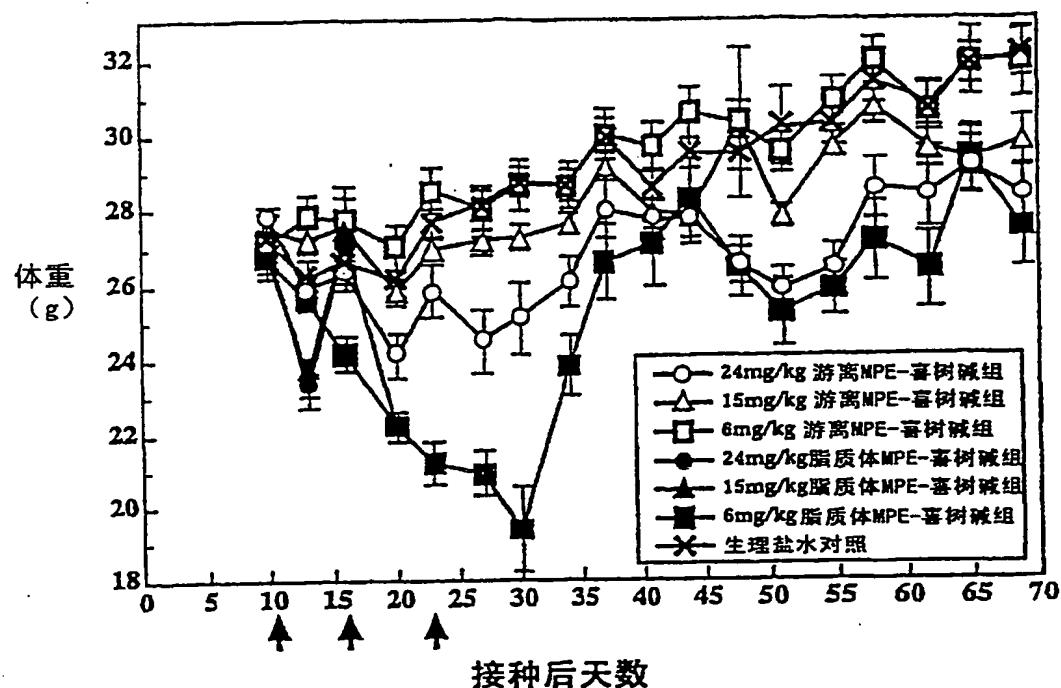


图2A

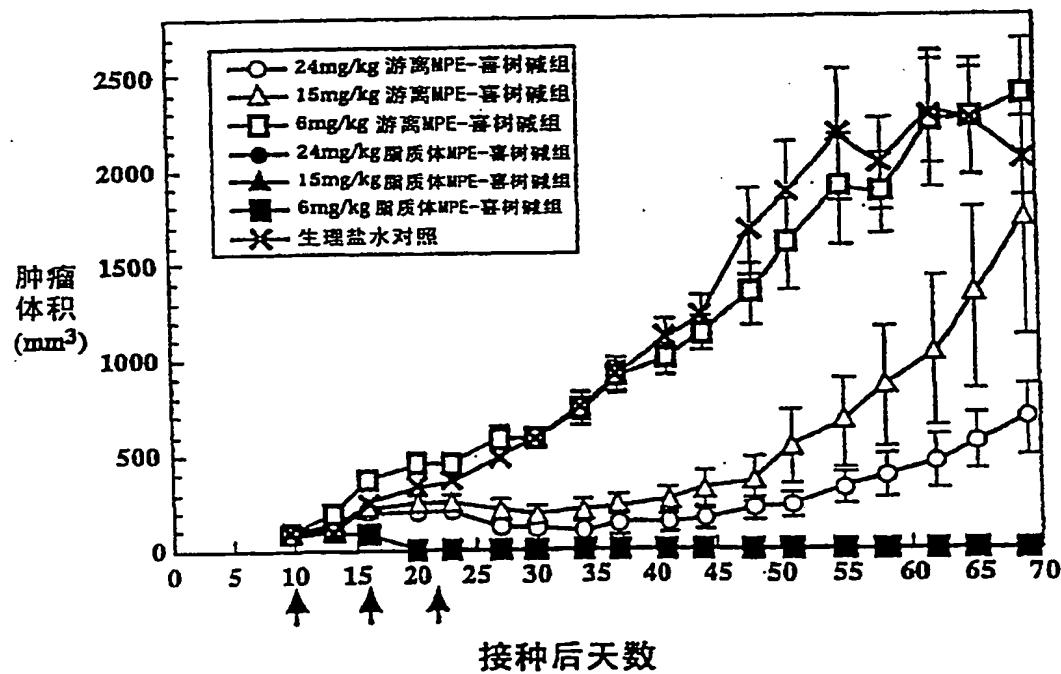


图2B

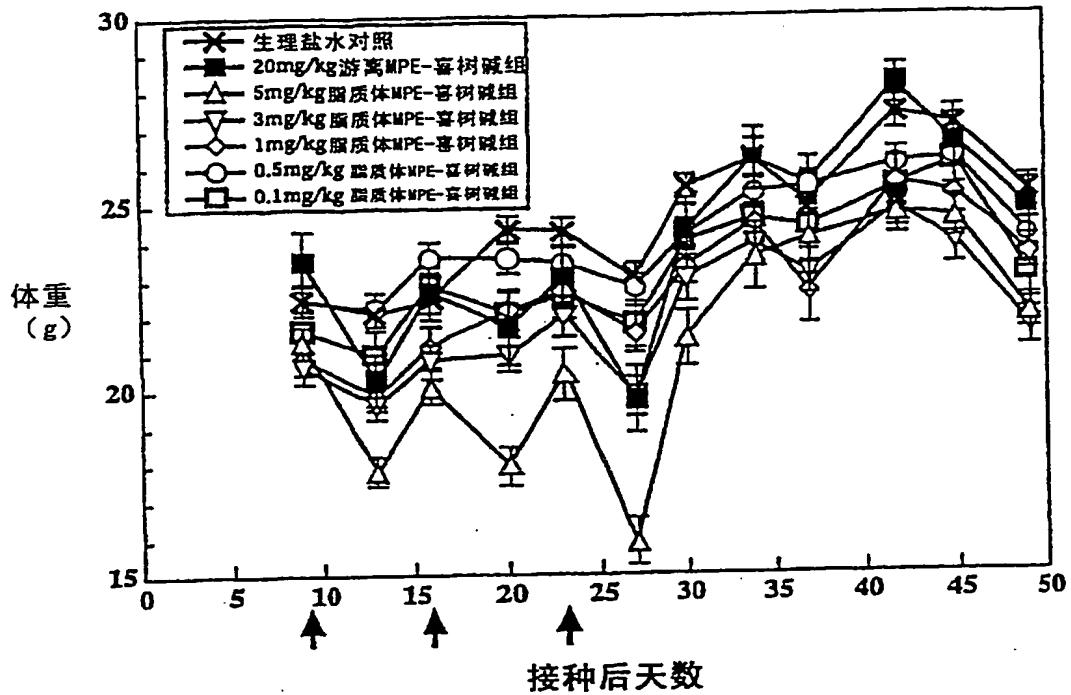


图3A

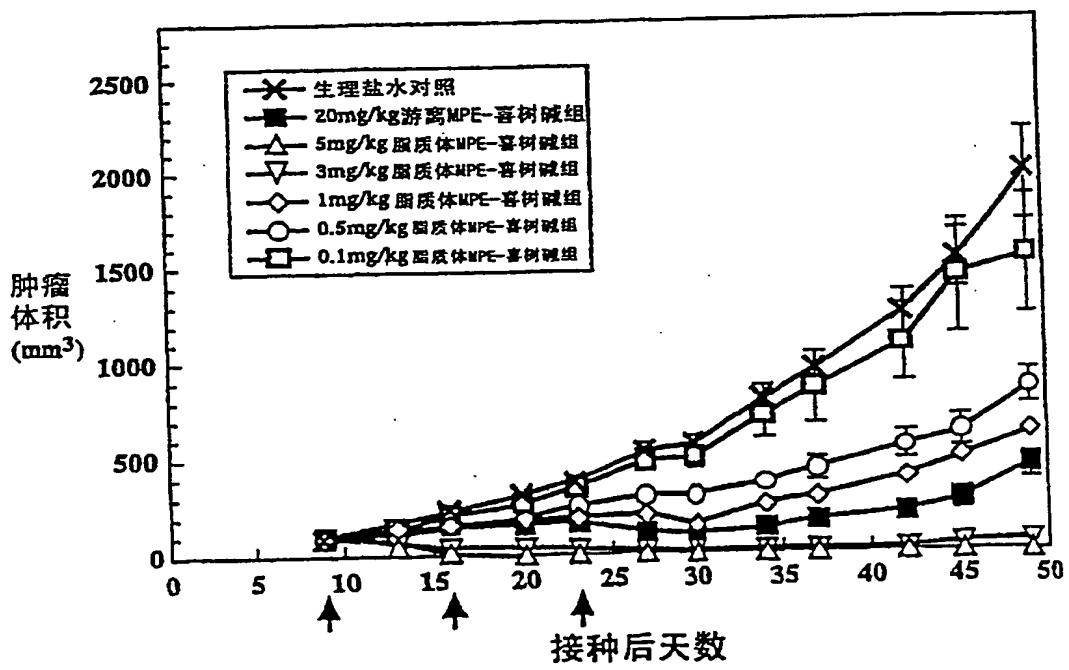


图3B

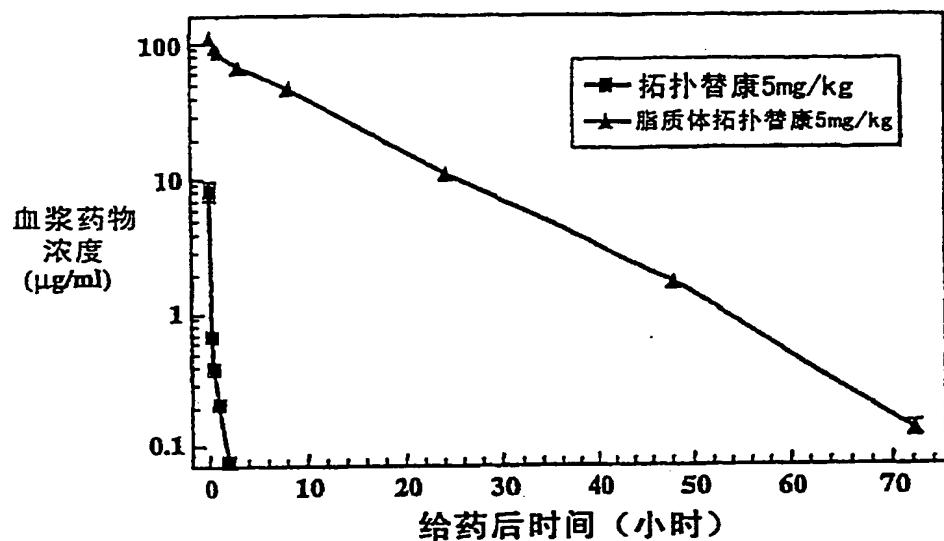


图4A

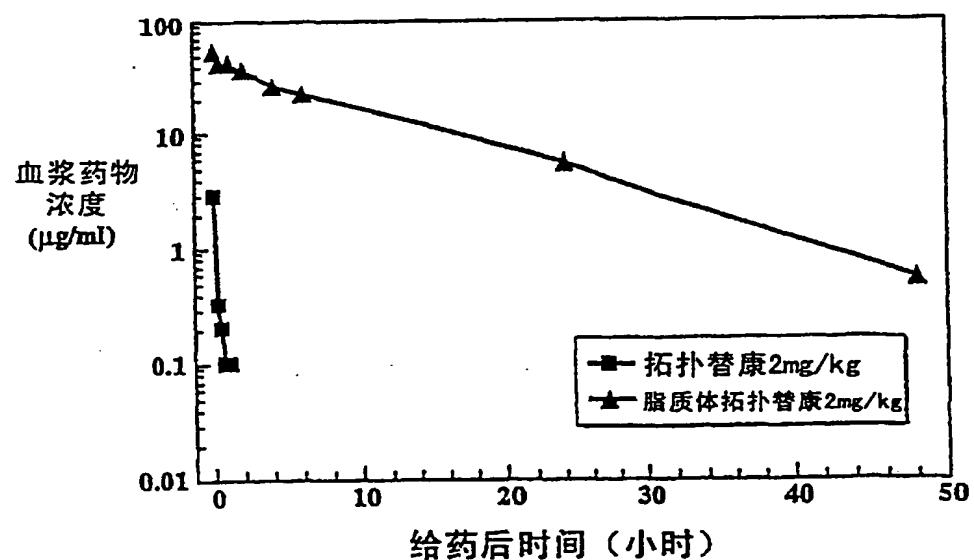


图4B

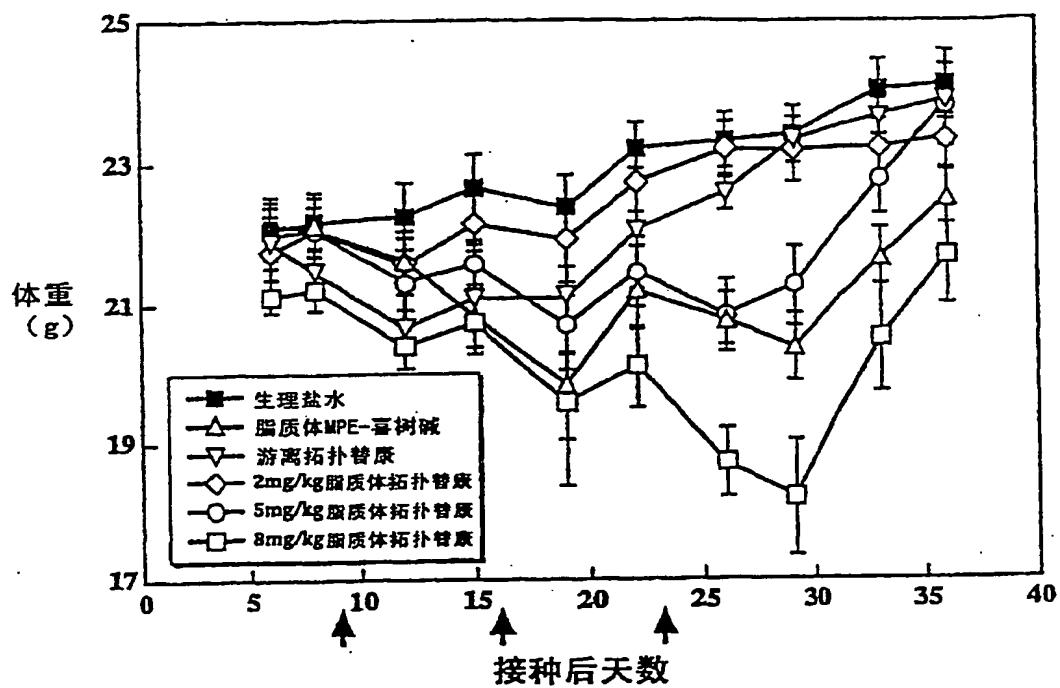


图5A

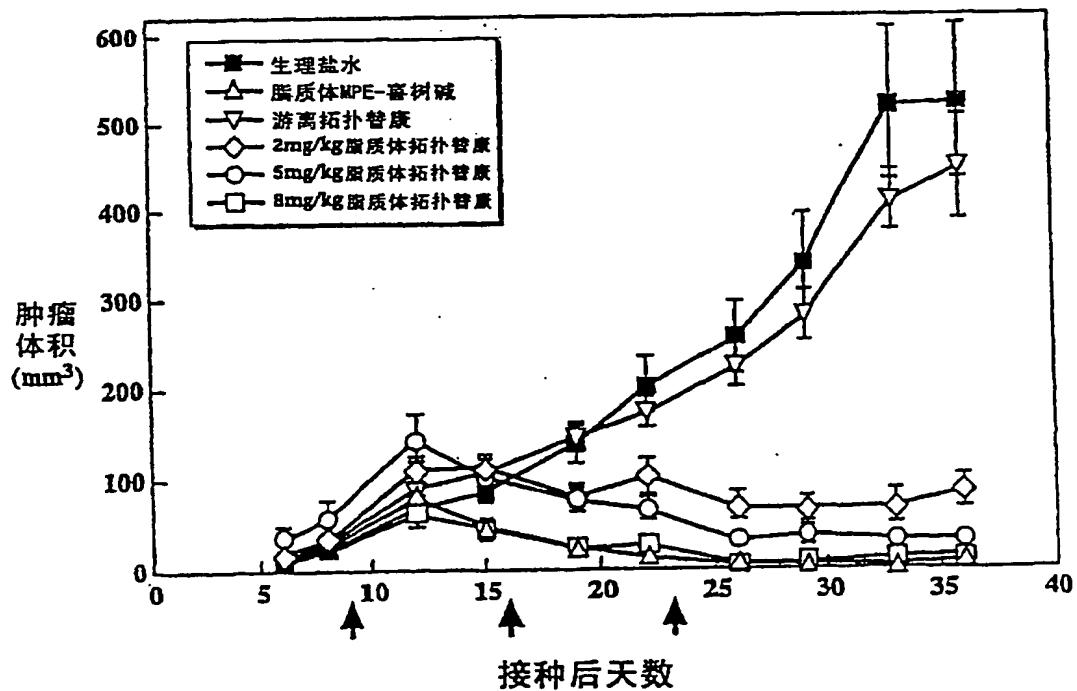


图5B

01-04-16

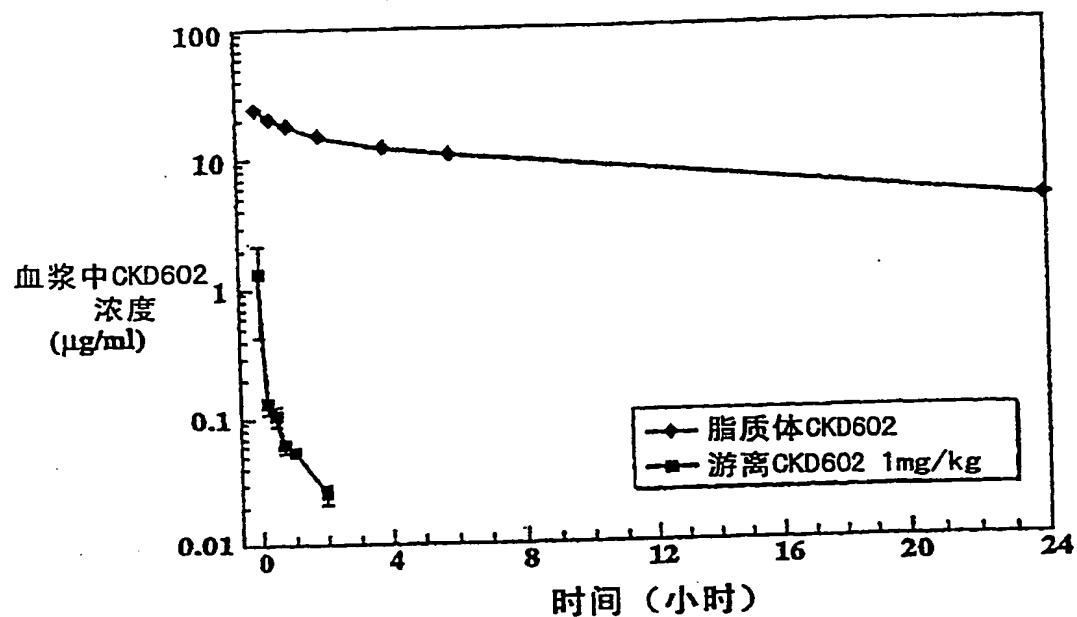


图6

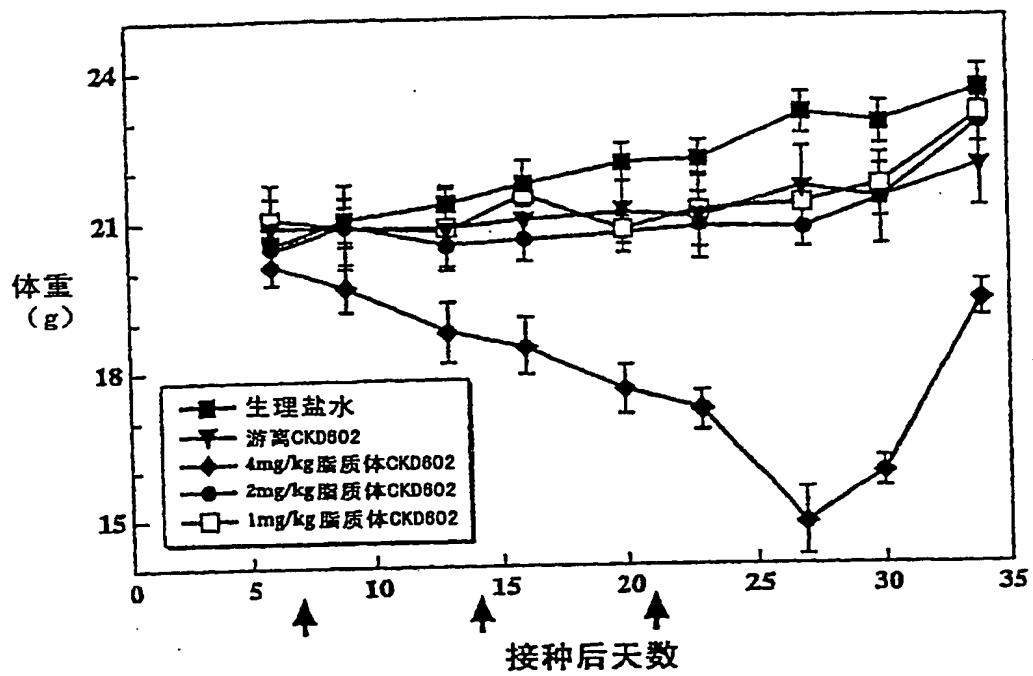


图7A

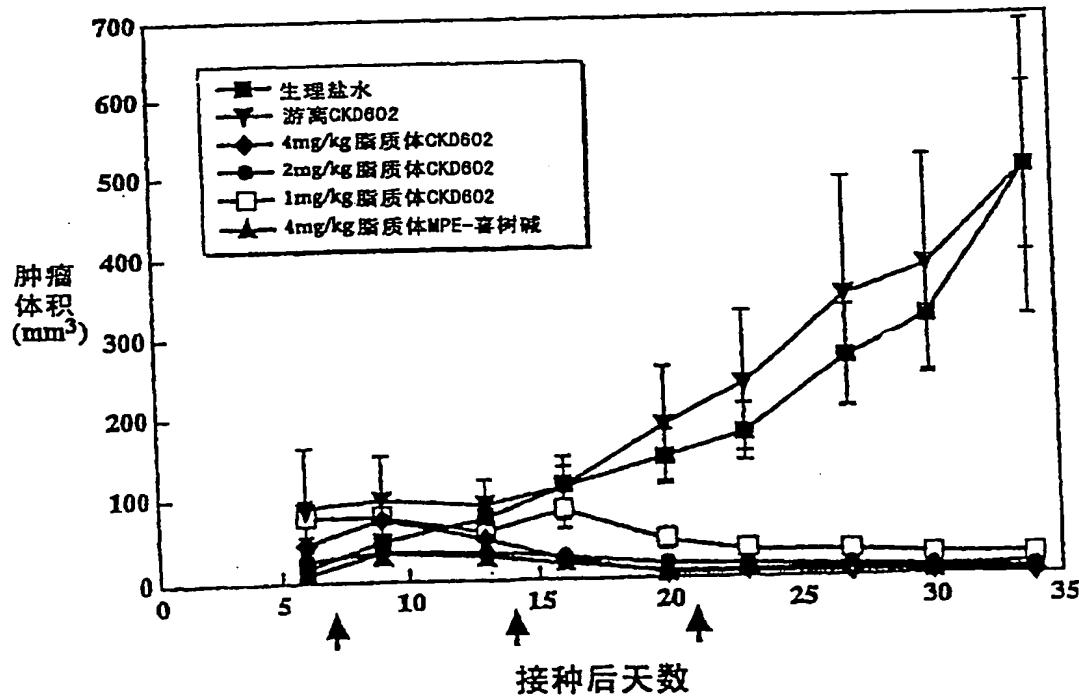


图7B